



**Facultad de Veterinaria**  
**Departamento de Genética**

Programa de doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

**Interacción Patógeno-Hospedador en la salmonelosis porcina.**  
**Modulación de la respuesta inmune intestinal por *Salmonella* y**  
**mecanismos de persistencia.**

Host-Pathogen interaction in swine salmonellosis.

Modulation of the intestinal immune response by *Salmonella* and persistence mechanisms.

**Tesis Doctoral**

Directora

Sara Zaldívar López

Director

Héctor Argüello Rodríguez

Autora

Natividad Bellido Carreras

Fecha de depósito tesis en el Idep: 5 de Diciembre de 2019

TITULO: *INTERACCIÓN PATÓGENO-HOSPEDADOR EN LA SALMONELOSIS  
PORCINA. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INTESTINAL  
POR SALMONELLA Y MECANISMOS DE PERSISTENCIA*

AUTOR: *Natividad Bellido Carreras*

---

© Edita: UCOPress. 2020  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---



**TÍTULO TESIS: Interacción Patógeno-Hospedador en la salmonelosis porcina. Modulación de la respuesta inmune intestinal por *Salmonella* y mecanismos de persistencia.**

**DOCTORANDO/A:** Natividad Bellido Carreras

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

La idea directriz del trabajo de tesis de Dña. Natividad Bellido Carreras ha sido la caracterización a nivel molecular de la interacción patógeno-hospedador, analizando, mediante un enfoque integrado como la técnica dual RNA-Seq, la modulación de la respuesta inmune porcina durante la infección por *Salmonella* Typhimurium. Para ello se realizó dual RNA-Seq de 3 situaciones diferentes: secuenciación de muestras porcinas de mucosa de íleon y nódulo linfático mesentérico infectadas a 2 d.p.i. con *S. Typhimurium*, y secuenciación de un estudio *in vitro* con la línea celular IPI-2I tras 24 horas de infección con la bacteria. La validación de los datos de secuenciación obtenidos se realizó mediante el empleo de diferentes técnicas como el uso de la biología molecular, microscopía, genómica funcional y proteómica. Finalmente, los resultados obtenidos se ajustan a los objetivos inicialmente previstos y son de gran interés para completar un mejor conocimiento de los mecanismos de defensa frente a *Salmonella* en la especie porcina. Los resultados han sido presentados en congresos nacionales e internacionales especializados, y parte de ellos han sido ya publicados, o están en proceso de publicación.

**Publicaciones:**

Bellido-Carreras N, Argüello H, Zaldívar-López S, Jiménez-Marín Á, Martins RP, Arce C, Morera L, Carvajal A, Garrido JJ. *Salmonella* Typhimurium Infection Along the Porcine Gastrointestinal Tract and Associated Lymphoid Tissues. *Vet Pathol.* 2019 Sep;56(5):681-690. doi: 10.1177/0300985819843682. Epub 2019 May 19. PMID: 31106677.

**Trabajos en congresos:**

- Natividad Bellido-Carreras, Sara Zaldívar-López, Héctor Argüello, Rocío Bautista, M. Gonzalo Claros, Juan J. Garrido. Gene expression reveals the role of autophagy in *Salmonella* Typhimurium replication during intestinal epithelial cells infection. International Society for Animal Genetics (ISAG2019). Lleida, España. 7-12 Julio 2019. Póster.
- Natividad Bellido-Carreras, Sara Zaldívar-López, Héctor Argüello, Rocío Bautista, Ángeles Jiménez-Marín, M. Gonzalo Claros, Juan J. Garrido. Simultaneous transcriptional profiling of *Salmonella* Typhimurium and its porcine intestinal epithelial host cell reveals insights into host-pathogen interaction. 6th European Veterinary Immunology Workshop. Utrecht, Holanda. Sept 5-7 2018. Póster
- Natividad Bellido-Carreras, Sara Zaldívar-López, Héctor Argüello, Juan J. Garrido. Análisis transcriptómico del patrón de expresión génica de *Salmonella* Typhimurium durante la infección. II Congreso de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, España; 9 de febrero 2018. Comunicación oral galardonada con el "Premio a la mejor comunicación oral".
- Natividad Bellido-Carreras, Sara Zaldívar-López, Héctor Argüello, Juan J. Garrido. Análisis transcriptómico de la respuesta inmune intestinal frente a *Salmonella* Typhimurium. VI Congreso Científico de Investigadores en Formación. Córdoba, España; 18 y 19 de enero 2018. Comunicación oral galardonada con el "Premio a la mejor comunicación oral" en el área de Ciencias Exactas y Naturales.
- Natividad Bellido-Carreras, Héctor Argüello, Juan J. Garrido. Alteración del microbioma intestinal por *Salmonella* entérica serovar Typhimurium y su efecto en la respuesta inmune frente a la infección. V Congreso Científico de Investigadores en Formación. Córdoba, España; 1 y 2 de diciembre 2016. Comunicación oral galardonada con el "Premio a la mejor comunicación oral" en el área de Ciencias Exactas y Naturales. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 5 de Diciembre de 2019

Firma del/de los director/es

**Fdo.:** Sara Zaldívar López

**Fdo.:** Héctor Argüello Rodríguez





El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba y financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2014-54089-R y AGL2017-87415-R) y el Plan Propio de la Universidad de Córdoba (Modalidad de estancias en centros extranjeros) para trabajar en el laboratorio del Dr. Robin Fåhræus en el Instituto de Genética Molecular del INSERM (París, Francia).



A mis mejores referentes, mis Padres.

A mi compañero de vida, Antonio.



## Resumen

El establecimiento de medidas de control eficientes que reduzcan la prevalencia de *Salmonella* en cerdos, principalmente el serotipo *S. Typhimurium*, es importante para disminuir la incidencia de esta zoonosis y para mejorar la sanidad animal. Para implementar nuevas estrategias de prevención es imprescindible conocer en profundidad la naturaleza de la interacción patógeno-hospedador. El uso de técnicas "ómicas" de vanguardia abre nuevos enfoques para abordar esta interacción en las enfermedades infecciosas. El estudio de la salmonelosis generalmente se ha abordado centrándose en el comportamiento de virulencia del patógeno o la respuesta inmune del hospedador por separado. En esta tesis doctoral se planteó como objetivo general profundizar en el conocimiento de los mecanismos de infección de *S. Typhimurium*, así como en la reacción del hospedador a dicha infección. Para abordar este objetivo se usaron modelos de infección *in vivo* e *in vitro*.

En primer lugar, se realizó un estudio histológico y molecular que evaluó factores como la colonización intestinal, la diseminación de la bacteria en heces y la persistencia de la bacteria. En él se analizaron muestras de los diferentes tramos del intestino y el tejido linfoide asociado (nódulos linfáticos mesentéricos, NLMs) tras una infección experimental *in vivo* de 30 días de duración con *S. Typhimurium*, definiendo 2 días post infección (d.p.i.) como el punto más agudo de la infección en todos los tejidos analizados y encontrando a 30 d.p.i. marcaje de *Salmonella* en las trabéculas de los NLMs.

Para analizar el perfil transcripcional de patógeno y hospedador en el sistema gastrointestinal durante la infección, se realizaron estudios mediante dual RNA-seq de mucosa de íleon porcino y NLMs regionales. En íleon infectado a 2 d.p.i. observamos la sobreexpresión de genes

inflamatorios que indican la presencia de una intensa respuesta inflamatoria mediada por IL1 y TNF, así como la subexpresión de genes regulados por la ruta de señalización de FXR relacionados con la inhibición del ciclo de absorción de las sales biliares. Para investigar en profundidad el papel de las células epiteliales intestinales, se realizó un estudio *in vitro* de infección de la línea celular IPI-2I tras 24 horas de infección. Se vio en el hospedador una elevada respuesta inflamatoria mediada por NF-κB y la alteración de la expresión de genes relacionados con la ruta de la autofagia (familias ULK y ATG). Por otro lado, los genes sobreexpresados del patógeno indicaron la presencia de una gran cantidad de efectores de las SPI-1 y SPI-2, a su vez englobados en funciones tan importantes como la invasión celular, la inmunomodulación y la formación de la vacuola que contiene *Salmonella* (SCV). Ensayos funcionales demostraron que cuando se inhibe la autofagia, la capacidad de replicación intracelular de *Salmonella* es limitada.

La respuesta a la infección en nódulos linfáticos regionales se abordó mediante el estudio de la respuesta transcriptómica en nódulos linfáticos mesentéricos (NLMs) porcinos infectados a 2 y 30 d.p.i., con *S. Typhimurium*. Inicialmente, la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta inmunitaria fue analizada y correlacionada con cambios en la morfología tisular y carga del patógeno, revelando una abundante infiltración de células fagocíticas y la sobreexpresión de genes proinflamatorios a 2 d.p.i., que desaparece a 30 d.p.i. Se observó una fuerte respuesta inflamatoria a consecuencia del reconocimiento mediado por TLR y la activación del inflamasoma, que contribuyen a la activación de la respuesta innata y muerte celular por piroptosis, procesos que desaparecen a 30 d.p.i. Mediante ensayos de presentación antigénica, se demostró la existencia de presentación cruzada, indicando que antígenos de *Salmonella* son presentados en moléculas MHC de clase I, dependientes de la activación del proteasoma.

## Summary

The establishment of efficient control programs for reducing prevalence and infection of *Salmonella* in pigs (mainly the *S. Typhimurium* serotype) is important to reduce the incidence of this zoonosis and to improve animal health. An effective management of this disease involves the knowledge and investigation of the host-pathogen interactions. The use of cutting-edge "omics" techniques in host-pathogen interactions opens up new approaches and lines of research to address infectious diseases. The study of salmonellosis has usually been addressed by focusing on either the virulence of the pathogen or on the host immune response, separately. Therefore, this doctoral thesis proposed to deepen on the knowledge of the mechanisms of infection of *S. Typhimurium*, and to describe the routes and molecular interactions involved in the immune response prompted by the host. To pursue this objective, *in vivo* and *in vitro* study models were used.

First, a histological and molecular study was performed to evaluate infection factors, such as intestinal colonization, the spread of bacteria in feces and the persistence of bacteria in tissues. Samples of the different sections of the intestine and associated lymphoid tissue (mesenteric lymph nodes, MLNs) were analyzed after a 30-day *in vivo* experimental infection with *S. Typhimurium*, defining 2 days post infection (d.p.i) as the strongest point of infection in all the tissues analyzed and finding that at 30 d.p.i. *Salmonella* persisted on the trabeculae of the MLNs.

For analyzing the transcriptional profile of pathogen and host in the gastrointestinal system during infection, we evaluated using dual RNA-seq the porcine ileum and regional MLNs. In infected ileum at 2 d.p.i. we observed an intense IL1 and TNF $\alpha$  mediated inflammatory response, as well as repression of genes regulated by the FXR signaling pathway, which inhibits the bile acid absorption.

To further investigate the role of intestinal epithelial cells, we performed an *in vitro* 24h infection study on the IPI-2I cell line. Data obtained from the host indicated the presence of a high inflammatory response mediated by NF- $\kappa$ B and the alteration of the expression of genes related to the autophagy route (ULK and ATG families). On the other hand, differentially expressed genes obtained from the pathogen indicated the presence of a large number of SPI-1 and SPI-2 effectors, which are involved in important functions such as cell invasion, immunomodulation and the formation of *Salmonella* containing vacuole (SCV). Functional studies demonstrated that when autophagy is inhibited, intracellular replication of *Salmonella* is limited.

Response to infection in regional lymph nodes was investigated by obtaining the transcriptional profile of infected MLNs at 2 d.p.i. and 30 d.p.i. Initially, the differential expression of genes related to the immune response was analyzed and correlated with changes in tissue morphology and pathogen load. Results revealed abundant phagocytic cell infiltration and overexpression of proinflammatory genes at 2 d.p.i., which disappears at 30 d.p.i. A strong TLR-mediated inflammatory response and inflammasome activation were found, contributing to innate response activation and cell death by pyroptosis (processed that at 30 d.p.i. are no longer overexpressed). By means of antigenic presentation assays, we demonstrated the cross-presentation phenomenon, indicating that *Salmonella* antigens are presented by MHC class I molecules dependent on proteasome activation.



# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1. <i>Importancia de Salmonella como toxi-infección agroalimentaria transmitida por el cerdo.....</i> | 3         |
| 2. <i>Control de Salmonella en ganado porcino .....</i>   | 4         |
| 3. <i>El género Salmonella.....</i>   | 6         |
| 4. <i>Mecanismos de virulencia de Salmonella: islas de patogenicidad.....</i>                         | 8         |
| 5. <i>Salmonelosis en cerdo .....</i>   | 12        |
| 6. <i>Estudio de la interacción patógeno-hospedador mediante dual RNA-Seq.....</i>                    | 25        |
| <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>33</b> |
| 1. <i>Infección Experimental.....</i>   | 35        |
| 2. <i>Recogida y procesado de muestras.....</i>   | 36        |
| 3. <i>Detección y cuantificación de Salmonella en heces.....</i>                                      | 38        |
| 4. <i>Bacterias.....</i>  | 39        |
| 5. <i>Técnicas celulares .....</i>  | 40        |
| 6. <i>Histopatología e Inmunohistoquímica.....</i>  | 46        |
| 7. <i>Microscopía.....</i>  | 47        |
| 8. <i>Ácidos nucleicos y técnicas de biología molecular .....</i>                                     | 50        |
| 9. <i>Proteínas .....</i>   | 62        |
| 10. <i>Análisis estadísticos.....</i>   | 64        |
| <b>CAPÍTULO 1 .....</b>   | <b>67</b> |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>69</b> |
| 1. <i>Seguimiento de los animales durante la infección.....</i>                                       | 69        |
| 2. <i>Detección y cuantificación de Salmonella en heces y diferentes tramos del intestino.....</i>    | 70        |
| 3. <i>Localización de Salmonella y cambios morfológicos en el intestino.....</i>                      | 72        |

|  |            |
|--|------------|
| 4. Localización de Salmonella y cambios morfológicos en órganos linfoides secundarios.....                                       | 76         |
| DISCUSIÓN .....  | 81         |
| <b>CAPÍTULO 2 .....</b>  | <b>85</b>  |
| RESULTADOS.....  | 87         |
| 1. Perfil transcripcional de la mucosa de íleon porcino infectada con Salmonella Typhimurium a 2 d.p.i. ....                     | 87         |
| 2. Respuesta inflamatoria en mucosa de íleon porcino en la infección por Salmonella Typhimurium.....                             | 94         |
| 3. Alteración del metabolismo de los lípidos en mucosa de íleon en la infección por Salmonella Typhimurium.....                  | 99         |
| 4. Estudio del papel de la vesícula biliar e hígado en la infección por Salmonella en el cerdo.....                              | 104        |
| 5. Perfil transcripcional de Salmonella Typhimurium durante la infección en íleon a 2 d.p.i. ....                                | 107        |
| DISCUSIÓN .....  | 111        |
| <b>CAPÍTULO 3 .....</b>  | <b>123</b> |
| RESULTADOS.....  | 125        |
| 1. Colonización de Salmonella Typhimurium y respuesta inmune innata de la línea celular epitelial intestinal porcina IPI-2I..... | 125        |
| 2. Perfil transcripcional de la línea celular IPI-2I infectada con Salmonella Typhimurium .....                                  | 128        |
| 3. Perfil transcripcional de Salmonella Typhimurium.....   | 137        |
| 4. ¿Está la ruta de autofagia involucrada en la formación del nicho de replicación de Salmonella?.....                           | 144        |
| DISCUSIÓN .....  | 153        |
| <b>CAPÍTULO 4 .....</b>  | <b>165</b> |
| RESULTADOS.....  | 167        |
| 1. Respuesta transcripcional de NLM infectados con S. Typhimurium a 2 d.p.i.....   | 168        |

|   |            |
|---|------------|
| 2. Perfil transcripcional de las muestras de NLM infectados con <i>Salmonella Typhimurium</i> a 30 d.p.i..... | 178        |
| 3. Antígenos de <i>Salmonella</i> son presentados en MHC de clase I.....                                      | 183        |
| 4. La presentación cruzada es dependiente del proteasoma.....   | 186        |
| DISCUSIÓN.....  | 191        |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>199</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>203</b> |



## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama de Sankey. ....  | 5  |
| Figura 2. Estructura género <i>Salmonella</i> .....   | 6  |
| Figura 3. Clasificación esquemática de la especie <i>Salmonella entérica</i> .. ....                                | 7  |
| Figura 4. Árbol filogenético del clado <i>Salmonella</i> .....  | 9  |
| Figura 5. Esquema de la transmisión de <i>Salmonella</i> en el cerdo.....   | 13 |
| Figura 6. Esquema del tejido linfoide asociado al intestino. ....   | 15 |
| Figura 7. Esquema de la estructura del nódulo linfático y las rutas de tráfico celular, de las células B y T.. .... | 21 |
| Figura 8. Aplicación de la técnica dual RNA-Seq para diferentes tipos de interacciones entre especies. ....         | 27 |

### MATERIAL Y MÉTODOS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Pasos generales que se siguieron en el análisis de RNA-Seq para la detección de genes diferencialmente expresados. .... | 57 |
| Figura 2. Flujo de trabajo empleado para las muestras del estudio dual RNA-Seq. ....  | 58 |

### CAPÍTULO 1

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Efecto de la infección por <i>Salmonella</i> Typhimurium en cerdos.....  | 70 |
| Figura 2. Cuantificación de <i>Salmonella</i> Typhimurium mediante qPCR TaqMan... ..   | 71 |
| Figura 3. Infección temprana por <i>Salmonella</i> Typhimurium en los distintos tramos de intestino delgado a 0, 1 y 2 d.p.i. ....             | 73 |
| Figura 4. Infección temprana por <i>Salmonella</i> Typhimurium en los distintos tramos de intestino delgado a 6 d.p.i. e intestino grueso..... | 75 |
| Figura 5. Infección por <i>Salmonella</i> Typhimurium en tonsilas y NLM. ....  | 79 |

### CAPÍTULO 2

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Validación de genes expresados diferencialmente en íleon infectado por <i>S. Typhimurium</i> a 2 d.p.i. .... | 89 |
|--|----|

|   |     |
|---|-----|
| Figura 2. Red de interacción generada a partir de la integración de rutas canónicas relacionadas con activación de la inflamación..                               | 95  |
| Figura 3. Ruta de señalización del interferón, obtenida mediante la herramienta de predicción de IPA.....   | 96  |
| Figura 4. Ruta del inflamasoma, obtenida mediante la herramienta de predicción de IPA..   | 98  |
| Figura 5. Red de interacción generada a partir de la integración de rutas canónicas relacionadas con el metabolismo de lípidos. ....                              | 100 |
| Figura 6. Red de interacción generada a partir de los genes directamente relacionados con el metabolismo de los lípidos. ....                                     | 101 |
| Figura 7. Ruta de señalización de FXR/RXR .....   | 103 |
| Figura 8. Inmunohistoquímica de <i>Salmonella</i> Typhimurium en vesícula biliar. ..  | 104 |
| Figura 9. Inmunohistoquímica de <i>Salmonella</i> Typhimurium en hígado. ....   | 105 |
| Figura 10. Estudio de expresión de genes relacionados con el metabolismo biliar..   | 106 |
| Figura 11. Ruta KEGG del proceso de infección por <i>Salmonella</i> . ....  | 109 |
| Figura 12. Modelo experimental de la modulación, ejercida por <i>Salmonella</i> sobre las células epiteliales, del ciclo de reciclaje de las sales biliares. .... | 117 |

### CAPÍTULO 3

|  |     |
|--|-----|
| Figura 1. Ensayo de protección a la gentamicina durante 2, 6 y 24 horas de infección.....  | 125 |
| Figura 2. Análisis de la interacción de <i>Salmonella</i> Typhimurium mediante microscopía electrónica de barrido.....                         | 126 |
| Figura 3. Concentración de IL8 en sobrenadantes de células IPI-2I infectadas con <i>Salmonella</i> Typhimurium durante 24 horas.....           | 128 |
| Figura 4. Validación de RNA-Seq mediante qPCR en la línea celular epitelial porcina IPI-2I infectada con <i>S. Typhimurium</i> . ....          | 130 |
| Figura 5. Funciones biológicas afectadas por la infección de <i>S. Typhimurium</i> en células IPI-2I tras 24 horas de infección (top 15). .... | 132 |
| Figura 6. Red de interacción entre moléculas relacionadas con la activación de respuesta inflamatoria..  | 135 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 7. Moléculas sobreexpresadas en IPI-2I infectadas con <i>S. Typhimurium</i> relacionadas con la activación de la respuesta antimicrobiana .....                          | 136 |
| Figura 8. Validación de RNA-Seq mediante qPCR de <i>S. Typhimurium</i> durante la infección de la línea celular porcina IPI-2I .....  | 138 |
| Figura 9. Interacción entre proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados de <i>Salmonella</i> Typhimurium durante la infección de las células IPI-2I.. ..... | 139 |
| Figura 10. Interacción de los genes identificados como factores de virulencia..   | 143 |
| Figura 11. Esquema de los principales genes de <i>Salmonella</i> asociados a las islas de patogenicidad 1 (SPI-1) y 2 (SPI-2) sobreexpresados en este estudio.....              | 144 |
| Figura 12. Moléculas sobreexpresadas en IPI-2I infectadas con <i>S. Typhimurium</i> relacionadas con la organización del citoplasma.....  | 146 |
| Figura 13. Efecto del inhibidor 3-MA en las células IPI-2I a 2, 6 y 24 horas.. .....  | 147 |
| Figura 14. Análisis a distintos tiempos de la invasión de células IPI-2I por <i>Salmonella</i> Typhimurium (cepa SL1344) utilizando el inhibidor 3-MA. ....                     | 148 |
| Figura 15. Análisis a distintos tiempos de la invasión de células IPI-2I por <i>Salmonella</i> Typhimurium utilizando el inhibidor 3-MA. ....                                   | 149 |
| Figura 16. Efecto del inhibidor 3-MA durante el proceso de infección.. .....  | 150 |
| Figura 17. Marcaje de LC3 en células IPI-2I control.....  | 151 |
| Figura 18. Marcaje de LC3 en células IPI-2I tratadas con 3-MA. ....   | 151 |
| Figura 19. Cuantificación de la molécula LC3. ....  | 152 |
| Figura 20. Esquema de los principales pasos de la ruta de autofagia.. .....   | 157 |
| Figura 21. Diagrama de los datos transcriptómicos que resumen la hipótesis de la posible modulación de la ruta de autofagia. ....   | 159 |
| Figura 22. Esquema que indica el punto de la ruta que bloquea el inhibidor 3-MA. ....   | 161 |
| Figura 23. Modelo experimental de la modulación ejercida por <i>Salmonella</i> sobre las células epiteliales en presencia y ausencia de 3-MA.....                               | 162 |

## CAPÍTULO 4

|   |     |
|---|-----|
| Figura 1. Funciones biológicas alteradas por la expresión diferencial de genes en NLM a 2 d.p.i. .... | 171 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Figura 2. Ruta de señalización del inflamasoma en NLM a 2 d.p.i. ....   | 174 |
| Figura 3. Ruta de procesamiento y presentación antigénica de KEGG.....  | 177 |
| Figura 4. Funciones biológicas alteradas por la expresión diferencial de genes en NLM a 30 d.p.i.. ....   | 180 |
| Figura 5. Estudio de la capacidad fagocítica de la línea celular 3D4/31 mediante citometría de flujo. ....  | 184 |
| Figura 6. Producción de IL2 tras el proceso de presentación de antígenos entre las células presentadoras 3D4/31 y las células T-CD8 + B3Z.. ....  | 186 |
| Figura 7. Efecto del inhibidor MG-132 en las células 3D4/31 a 24 horas. ....  | 187 |
| Figura 8. Producción de IL2 tras el proceso de presentación de antígenos entre las células presentadoras 3D4/31 y las células T-CD8 + B3Z usando el inhibidor de proteasoma MG-132.....               | 188 |
| Figura 9. Producción de IL2 tras el proceso de presentación de antígenos entre las células presentadoras 3D4/31 y las células T-CD8+ B3Z usando el inhibidor de autofagia 3-metiladenina (3-MA). .... | 189 |



## ÍNDICE DE TABLAS

### MATERIAL Y MÉTODOS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Muestras recogidas de la infección experimental (Réplicas A y B).....                                    | 37 |
| Tabla 2. Secuencias de los cebadores y sonda empleados en la PCR TaqMan para detección de <i>Salmonella</i> ..... | 39 |
| Tabla 3. Lista de cebadores empleados en q-PCR para las muestras porcinas de íleon, IPI-2I y NLM.....             | 53 |
| Tabla 4. Lista de cebadores empleados en q-PCR para las muestras de <i>Salmonella</i> .....                       | 54 |
| Tabla 5. Cebadores usados para el diseño de la construcción en el vector pGEMT. ....                              | 59 |

### CAPÍTULO 1

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Valores de cuantificación y profundidad de infiltración de <i>Salmonella</i> en la mucosa intestinal y nódulos linfáticos mesentéricos.....                                  | 74 |
| Tabla 2. Valores de cuantificación de macrófagos y neutrófilos en la mucosa intestinal de yeyuno, íleon y colon en cerdos infectados con <i>S. Typhimurium</i> a 1, 2 y 6 d.p.i. .... | 74 |
| Tabla 3. Cuantificación y localización de macrófagos en NLM en cerdos infectados con <i>S. Typhimurium</i> (día 1, día 2, día 6, día 14 y día 30). ....                               | 78 |

### CAPÍTULO 2

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de lecturas limpias de secuenciación de ARN obtenidas de las muestras de mucosa de íleon. ....   | 88 |
| Tabla 2. Top 50 genes sobre- y sub-expresados en íleon a 2 d.p.i. tras la infección por <i>S. Typhimurium</i> . ....  | 90 |
| Tabla 3. Funciones biológicas afectadas en la infección de <i>S. Typhimurium</i> en íleon.....  | 91 |
| Tabla 4. Principales rutas de señalización afectadas por los genes diferencialmente expresados en mucosa de íleon infectado por <i>Salmonella Typhimurium</i> a 2 d.p.i. mediante el software IPA. .... | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 5. Expresión de genes de <i>Salmonella</i> Typhimurium en íleon porcino a 2 d.p.i. .... | 108 |
|---|-----|

### CAPÍTULO 3

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 1. Resultados de secuenciación de ARN de IPI-2I control e infectada con <i>S. Typhimurium</i> . ....  | 129 |
| Tabla 2. Top 50 genes diferencialmente expresados en células IPI-2I a 24 h.p.i. ....  | 131 |
| Tabla 3. Principales rutas de señalización afectadas por los genes diferencialmente expresados en la línea celular epitelial porcina IPI-2I infectada por <i>Salmonella</i> Typhimurium, obtenidas mediante el software IPA. .... | 134 |
| Tabla 4. Genes involucrados en diferentes funciones biológicas, incluyendo el Log <sub>2</sub> de su valor de cambio (FC) ....  | 140 |
| Tabla 5. Grupo de genes diferencialmente expresados identificados como factores de virulencia de <i>Salmonella</i> , y su valor de cambio expresado en Log <sub>2</sub> . ....  | 142 |
| Tabla 6. Genes diferencialmente expresados relacionados con el proceso de autofagia obtenidos de los datos de RNA-seq. ....   | 145 |

### CAPÍTULO 4

|  |     |
|--|-----|
| Tabla 1. Resultados de secuenciación de ARN de NLM control e infectados con <i>S. Typhimurium</i> a 2 d.p.i y 30 d.p.i. .... | 168 |
| Tabla 2. Top 40 genes diferencialmente expresados en NLM tras la infección con <i>S. Typhimurium</i> (2 d.p.i.). ....        | 170 |
| Tabla 3. Rutas de señalización afectadas por la expresión diferencial de genes en NLM a 2 d.p.i. ....                        | 173 |
| Tabla 4. Top 40 genes diferencialmente expresados en NLM tras la infección con <i>S. Typhimurium</i> (30 d.p.i.). ....       | 179 |
| Tabla 5. Rutas de señalización afectadas por la expresión diferencial de genes en NLM a 30 d.p.i. ....                       | 182 |

## ABREVIATURAS

|               |  |
|---------------|--|
| <b>3-MA</b>   | 3-Metiladenina   |
| <b>ADNc</b>   | ADN copia  |
| <b>d.p.i.</b> | Días post-infección  |
| <b>DAPI</b>   | 4', 6-diamidino-2-fenilindol   |
| <b>DMSO</b>   | Dimetil Sulfóxido  |
| <b>EFSA</b>   | Agencia Europea de Seguridad Alimentaria                                 |
| <b>ELISA</b>  | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas                              |
| <b>FC</b>     | Valor de cambio  |
| <b>FDR</b>    | Valor de p corregido   |
| <b>FITC</b>   | Isotiocianato de fluoresceína  |
| <b>GALT</b>   | Tejido linfoide asociado al intestino                                    |
| <b>GE</b>     | Equivalentes de genomas  |
| <b>h.p.i</b>  | Horas post infección   |
| <b>IFIT</b>   | proteínas inducidas por interferón con repeticiones tetratricopeptídicas |
| <b>IFN</b>    | Interferón   |
| <b>IHC</b>    | Imunohistoquímica  |
| <b>IL</b>     | Interleuquina  |
| <b>IPA</b>    | Ingenuity Pathway Analysis   |
| <b>KEGG</b>   | Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto                                 |
| <b>LB</b>     | Medio Luria Beltrani   |
| <b>LPS</b>    | Lipopolisacárido   |
| <b>LRR</b>    | Dominio de repetición rico en leucina                                    |
| <b>MHC</b>    | Complejo Mayor de Histocompatibilidad                                    |
| <b>MTT</b>    | <i>(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)</i>   |
| <b>NF-κB</b>  | Factor nuclear κB  |
| <b>NLM</b>    | Nódulos Linfáticos Mesentéricos  |
| <b>NLR</b>    | Receptores tipo Nod  |
| <b>NO</b>     | Óxido nítrico  |
| <b>OVA</b>    | Ovoalbúmina  |
| <b>PAMP</b>   | Patrones moleculares asociados a patógenos                               |
| <b>PATRIC</b> | Centro de integración de recursos de sistemas de patógenos               |
| <b>PBS</b>    | Tampón fosfato salino  |
| <b>PE</b>     | Fosfatidiletanolamina  |
| <b>PFA</b>    | Paraformaldehído   |
| <b>PI3K</b>   | fosfoinositida 3-quinasa de clase III                                    |
| <b>PI3P</b>   | Fosfatidilinositol-3-fosfato   |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>PP</b>      | Placas de Peyer   |
| <b>PRR</b>     | Receptores de reconocimiento de patógenos   |
| <b>qPCR</b>    | PCR cuantitativa  |
| <b>RIN</b>     | Valor de integridad del ARN (RNA-integrity number)                                |
| <b>RLR</b>     | Receptores tipo RIG   |
| <b>ROS</b>     | Especies reactivas de oxígeno   |
| <b>SCV</b>     | Vacuola que contiene Salmonella   |
| <b>SLC</b>     | Transportador de solutos  |
| <b>SPI-1/2</b> | Islas de patogenicidad 1/2  |
| <b>STRING</b>  | Herramienta de búsqueda para la recuperación de genes / proteínas que interactúan |
| <b>T3SS</b>    | Sistema de secreción tipo 3   |
| <b>TCR</b>     | Receptor de célula T  |
| <b>TEM</b>     | Microscopia electrónica de transmisión  |
| <b>Ttr</b>     | Tetraciónato reductasa  |
| <b>TLR</b>     | Receptor tipo Toll  |
| <b>TNF</b>     | Factor de necrosis tumoral  |
| <b>TSA</b>     | Agar Soja-triptona  |
| <b>UBL</b>     | Sistema tipo ubiquitina   |
| <b>UE</b>      | Unión Europea   |
| <b>UFC</b>     | Unidades formadoras de colonias   |

# **Introducción**



## **1. IMPORTANCIA DE *SALMONELLA* COMO TOXI-INFECCIÓN AGROALIMENTARIA TRANSMITIDA POR EL CERDO**

La salmonelosis es una de las zoonosis más importantes (por su prevalencia a nivel mundial) que tiene su origen en el consumo de agua o alimentos contaminados con la bacteria *Salmonella*. En los últimos años, se ha doblado el esfuerzo por caracterizar los agentes etiológicos implicados en las toxi-infecciones destacando la infección por el género *Salmonella* como la primera o segunda causa de infecciones de origen alimentario según la región del mundo en la que nos encontremos (CDC, 2019; EFSA, 2018). Los datos recogidos por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en 2018, muestran que la salmonelosis es la segunda causa de toxiinfecciones alimentarias (EFSA, 2018). En el año 2018, fueron notificados un total de 94.278 casos confirmados de salmonelosis, lo que dio como resultado un índice de notificación de 23,4 casos por cada 100.000 habitantes. De estos individuos enfermos, 16.796 fueron hospitalizados y un total de 156 enfermos fallecieron como consecuencia de la infección (tasa de mortalidad del 0.25%). Estos datos demuestran la importancia de la enfermedad, tanto por el relevante número de casos como por el riesgo de hospitalización y complicaciones.

Esta incidencia varía a lo largo de los años y, aunque hay picos esporádicos, la tendencia en la última década es decreciente, lo cual se ha asociado a la eficiencia y éxito de los programas de control aplicados en avicultura, que están definidos por legislación europea (Reglamento(2160/2003), 2003) y son obligatorios en todos los países miembros de la UE. Si bien en un primer momento, las directivas de la UE se hacían extensibles al ganado porcino, en la actualidad los programas de control en esta especie continúan siendo de carácter voluntario, motivo por el cual únicamente algunos países los tienen implementados (Alban et al., 2012; Osterkorn et al., 2001).

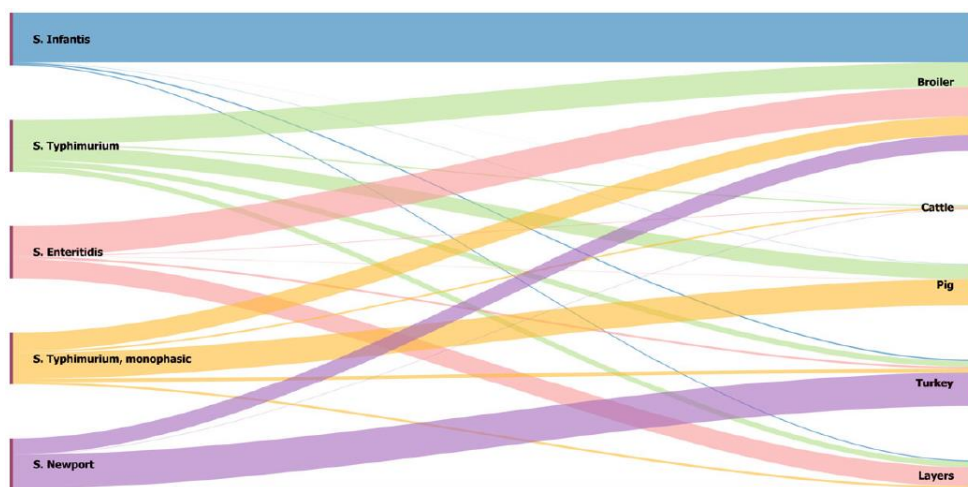
La incidencia tan elevada de casos en personas obliga, en gran medida, a promover una mejora de los sistemas de control establecidos. Estas mejoras deben incluir, por ejemplo, un mayor conocimiento sobre los patógenos, la implantación de nuevos programas de bioseguridad en explotaciones ganaderas, la minimización de contaminaciones cruzadas en los mataderos, mejorando las condiciones higiénicas de procesado y manipulación, y una extensa formación de los consumidores respecto a estos temas para aumentar la prevención de enfermedades de transmisión alimentaria (Larsen et al., 2014).

## 2. CONTROL DE *SALMONELLA* EN GANADO PORCINO

Actualmente, la contaminación por *Salmonella* en productos cárnicos es una de las mayores preocupaciones de seguridad alimentaria en la Unión Europea. Es fundamental prevenir la transmisión del patógeno en la cadena alimentaria para minimizar el riesgo de contaminación de los alimentos. Los animales de producción están señalados como el principal origen de infección, siendo un reservorio directo de *Salmonella*. Entre estos reservorios destacan principalmente la carne y huevos, entre otros productos como derivados lácteos, piensos, etc., (Ricke, 2006; Sapkota et al., 2007). De acuerdo con el último informe de tendencias en zoonosis ya mencionado (EFSA, 2018) el principal origen de infecciones por *Salmonella* son los huevos y carne de ave, seguida de la de cerdo y en menor medida la carne de bovino. Se estima que los huevos y productos derivados del huevo están asociados a más del 60% de los casos, mientras que un 28,3% de los casos de salmonelosis se asociarían al consumo de carne de cerdo contaminada (EFSA, 2018).



Para mejorar esta situación, resulta indispensable instaurar programas de control en los que se reduzca la prevalencia de infección en especies animales distintas de aquellas en las que ya están vigentes. Como se ha mostrado anteriormente, después de las aves de corral, el origen más frecuente de la salmonelosis es el consumo de carne de cerdo contaminada. De hecho, actualmente, la prevalencia de *Salmonella* en productos de origen porcino, representa un 80% aproximadamente del total de aislados aportados en 2018 por la UE, siendo *S. Typhimurium* el serovar más frecuentemente encontrado (28,3%) en la carne de cerdo (EFSA, 2018; Knecht et al., 2015) (**Figura 1**).



*Figura 1. Diagrama de Sankey. En él se representa la distribución de los 5 serovares más representativos de Salmonella aislados de casos de salmonelosis humanas en la UE, los cuales fueron adquiridos a través de alimentos derivados de: carne de ave (broiler), vacuno (cattle), cerdo (pig), pavo (turkey) y huevos y derivados lácteos (layers) (EFSA, 2018).*

### 3. EL GÉNERO *SALMONELLA*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, el cual incluye bacterias anaerobias facultativas, no formadoras de esporas y gram-negativas en forma de bastón (**Figura 2**) (Tindall et al., 2005). La mayoría de las especies de *Salmonella* son móviles y pueden infectar una gran variedad de hospedadores animales, incluidos reptiles, mamíferos, aves y anfibios, y también hay estudios que demuestran que también puede infectar plantas (Jacobsen et al., 2011; Wiedemann et al., 2014). Otros ejemplos, filogenéticamente cercanos a *Salmonella*, de enterobacterias son *Escherichia*, *Shigella* y *Citrobacter* (Edwards et al., 2002).

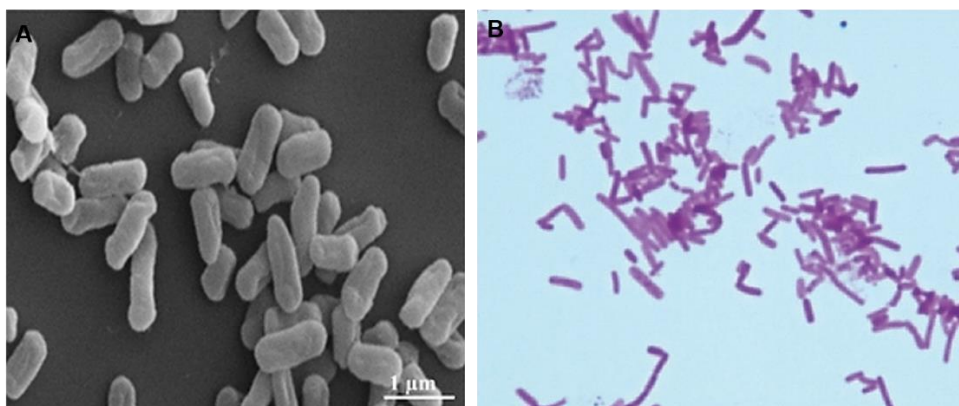


Figura 2. Estructura género *Salmonella*. (A) Imagen obtenida por microscopía electrónica (Vinod et al., 2017). (B) Imagen obtenida mediante tinción de gram (Weiman, 2015).

El género *Salmonella* se divide actualmente en dos especies principales, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Sanchez-Vargas et al., 2011; Tindall et al., 2005). *Salmonella enterica* se subdivide, a su vez, en seis

subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (**Figura 3**). Históricamente, *Salmonella enterica* subsp. V era *bongori*, que ahora se considera una especie diferente (Desai et al., 2013; Porwollik et al., 2004).

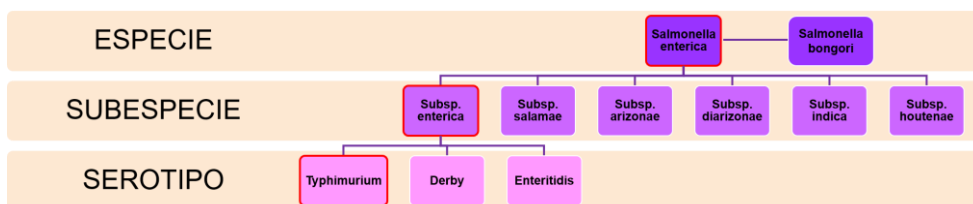


Figura 3. Clasificación esquemática de la especie *Salmonella enterica*. En rojo la especie, subespecie y serotipo de la bacteria empleada en esta tesis doctoral.

Las subespecies de *Salmonella* se clasifican en serovares según el esquema de clasificación de White-Kauffman, que se basa en antisueros que reconocen dos antígenos de superficie altamente variables, O (antígeno de lipopolisacárido O) y H (proteínas flagelares) (Grimont and Weill, 2007). Hay más de 2.500 serovares de *Salmonella*, la mayoría de los cuales pertenecen a la subsp. *enterica*. Los serovares de esta subespecie colonizan regularmente vertebrados de sangre caliente, y representan el 99% de las infecciones humanas por *Salmonella*. Por otro lado, los serovares de *Salmonella bongori* y el resto de la subespecie de *Salmonella enterica* generalmente se asocian a vertebrados de sangre fría o al medio ambiente (Grimont et al., 2007; McQuiston et al., 2004).

Los serovares pertenecientes a la subsp. *enterica* difieren en su especificidad con el hospedador y en los tipos de enfermedades que

producen. Algunos serovares están restringidos por el hospedador, mientras que otros pueden infectar una amplia variedad de huéspedes animales (Wiedemann et al., 2014). Las enfermedades causadas por la subsp. *entérica* varían desde una gastroenteritis autolimitante a una posible infección sistémica, potencialmente mortal en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas. Algunos serovares son “hospedador-generalistas”, como *S. enterica* serovar Typhimurium, que es capaz de causar enfermedad en humanos, ganado, cerdos, caballos, aves de corral, e incluso, roedores. Otros serovares, sin embargo, son “hospedador-especialistas” y sólo son capaces de infectar a un grupo muy reducido de hospedadores, como ocurre con *S. enterica* serovar Typhi, que solo causa enfermedad en humanos y primates superiores (Hoelzer et al., 2011).

#### **4. MECANISMOS DE VIRULENCIA DE *SALMONELLA*: ISLAS DE PATOGENICIDAD**

A partir de un punto de divergencia producido hace aproximadamente 120-160 millones de años surgieron los géneros *Escherichia* y *Salmonella* (**Figura 4**) (Ochman and Wilson, 1987). Es importante destacar que casi un 25% del genoma de *Salmonella* consiste en un tipo de material genético que está ausente en el genoma de *Escherichia coli* (McClelland et al., 2001; Porwollik and McClelland, 2003). La evolución de la patogenicidad de *Salmonella* está relacionada con muchos factores de adaptación al ambiente y supervivencia, entre los que destacamos la adquisición de factores de virulencia englobados en las regiones denominadas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI), las cuales están organizadas como agrupaciones de genes en el cromosoma. Actualmente, se han descrito

más de 10 SPI, de las cuales la SPI-1 y SPI-2 son las que tienen mayor relevancia al estar relacionadas con el proceso de infección de la bacteria (Groisman and Ochman, 1997; Hensel, 2004; Kelly et al., 2009).

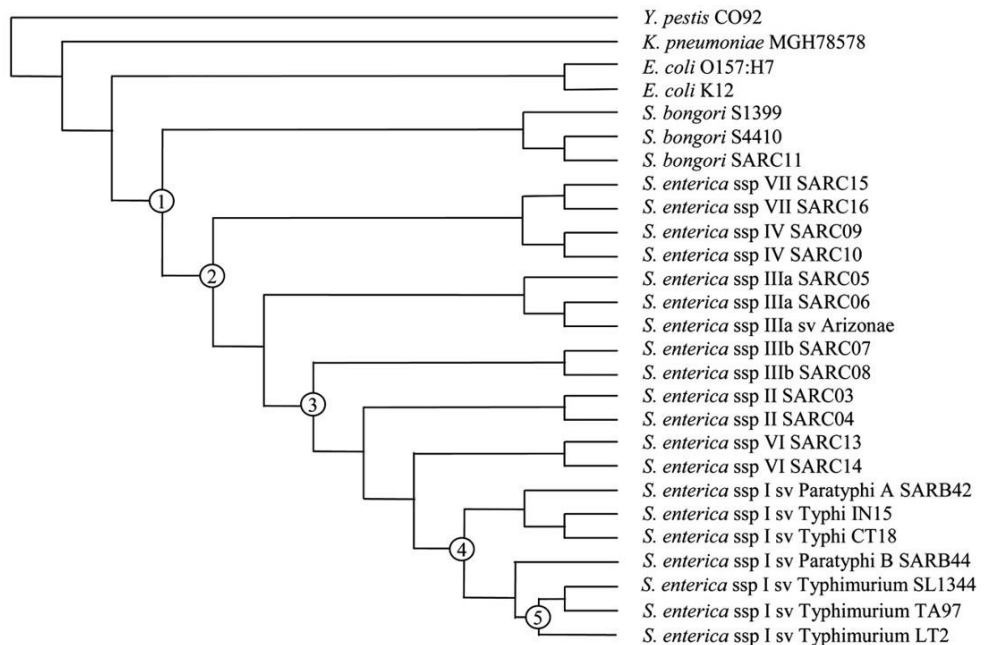


Figura 4. Árbol filogenético del clado Salmonella. Se indican cinco etapas principales en la evolución de Salmonella: 1, divergencia de Salmonella de E. coli; 2, separación de S. enterica de S. bongori; 3, evolución de las cepas difusas de S. enterica; 4, partición de S. enterica ssp. I; y 5, desarrollo de STM (Porwollik et al., 2002)

Las principales características de cada isla son:

**SPI-1:** Codifica un sistema de secreción de tipo III (T3SS) que media la translocación de un complejo conjunto de proteínas efectoras en las células del hospedador. Un subconjunto de proteínas efectoras SPI-1 media la

invasión de células no fagocíticas por *Salmonella*, un proceso que implica la modificación del citoesqueleto de actina en dichas células. Muchos de los efectores de SPI-1 (incluidos *sopB*, *sopE*, *sopE2*, *sipA*, *sipC* y *sopA*) contribuyen a la inflamación intestinal al estimular la producción de la citoquina proinflamatoria interleuquina 8 (IL8) a través de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y NF- $\kappa$ B, que desestabiliza las uniones estrechas y estimula la migración transepitelial de neutrófilos hacia la luz intestinal. Los receptores tipo Toll (TLR) se activan después de detectar los componentes de *Salmonella* (por ejemplo, el lipopolisacárido, LPS); Esto promueve la activación de los macrófagos y el aumento de la muerte por el compartimento fagosómico, así como la activación transcripcional de los genes que codifican las caspasas (Galán and Zhou, 2000).

**SPI-2:** Esta isla codifica otro T3SS en *Salmonella* que se activa por bacterias englobadas en un ambiente intracelular y, además, codifica la tetrionato reductasa (Ttr), la cual está involucrada en la respiración anaeróbica de la bacteria. Los principales efectores de SPI-2 incluyen *sifA*, *pipB2*, *sseF*, *sseG*, *sseJ*, *spvB*, *steA* y *sopD2*, los cuales afectan a la dinámica de microtúbulos y al movimiento y modulación de las vacuolas que contienen *Salmonella* (*Salmonella*-containing vacuole, SCV) (Hensel et al., 1997).

**SPI-3:** La principal función de virulencia codificada por esta isla es el sistema de captación de  $Mg^{+2}$  de alta afinidad formado por los *mgtC* y *mgtB* que se requiere para la adaptación a las limitaciones nutricionales del ambiente generado en el interior del fagosoma (Amavisit et al., 2003).

**SPI-4:** El papel de esta isla respecto a la virulencia de *Salmonella* aún no se ha analizado en detalle, pero hay varios factores de virulencia englobados en dicha isla (Amavisit et al., 2003).

**SPI-5:** Codifica proteínas efectoras para ambos sistemas de secreción, codificados por SPI-1 y SPI-2. Por ejemplo, *sopB* es translocado por el T3SS codificado por SPI-1 y su expresión está bajo el control de *hilA*, el regulador transcripcional central de SPI-1. Además, *sopB* es una fosfatasa de inositol involucrada en desencadenar la secreción de fluidos que resultan en síntomas relacionados con diarrea. Otro ejemplo, en contraste, como *pipB* es un efector translocado por el T3SS codificado por SPI-2 bajo el control del sistema de dos componentes *ssrA* y *ssrB* (Knodler et al., 2002).

**SPI-6:** Esta isla contiene el grupo de genes “saf” relacionado con fimbrias, el gen *pagN* que codifica una invasina esencial en el proceso de infección y varios genes de función desconocida. Al eliminar esta isla se observó una invasión reducida en cultivos in vitro (Folkesson et al., 2002).

**SPI-7:** Un factor de virulencia importante codificado por esta isla es el antígeno Vi, definido como un exopolisacárido capsular. También, la proteína efectora *sopE* perteneciente al T3SS codificado por SPI-1 se ha visto que está presente en SPI-7 (Hensel, 2004).

**SPI-8:** No hay mucha información acerca de esta isla. Parece ser que los factores de virulencia putativos descritos en ella son genes de bacteriocina, pero hasta ahora no se han aportado datos funcionales (Hensel, 2004).

**SPI-9:** Los factores de virulencia putativos codificados por esta isla forman un sistema de secreción tipo I y presenta una gran proteína similar a la toxina RTX (Parkhill et al., 2001).

**SPI-10:** Los principales factores de virulencia codificados por esta isla que se han descrito son las fimbrias de “Sef” (Townsend et al., 2001).

## 5. SALMONELOSIS EN CERDO

La importancia de la salmonelosis en el cerdo se puede dividir en dos puntos de vista. Uno de ellos es desde la perspectiva de enfermedad animal, y por otro lado, y quizás el más importante actualmente, es el problema de salud pública que representa (EFSA, 2018), teniendo en cuenta que para establecer medidas de control eficientes es necesario conocer la enfermedad.

La gravedad de la infección por *Salmonella* en el cerdo depende de (1) edad a la que se produzca la infección (más grave cuanto más joven es el cerdo), (2) estado del sistema inmunitario del animal, (3) serotipo infectante y (4) virulencia de la cepa. Por lo general, salvo infecciones en cerdos jóvenes, animales inmunodeprimidos o cepas del serotipo Cholerasuis o virulentas del serotipo Typhimurium, las infecciones por *Salmonella* cursan de forma subclínica o producen una diarrea blanda y autolimitante. La infección puede afectar a cerdos de cualquier edad, aunque lo común es que los animales se infecten entre las 6 y 12 semanas de edad, si bien se describen casos durante todo el periodo de transición y cebo (10-180 días de vida) y más raramente en edades tempranas (Boyen et al., 2008; Gray et al., 1996).

En las infecciones entéricas del serotipo Typhimurium los principales signos clínicos son diarrea líquida de tono amarillento, fiebre, pérdida del apetito y deshidratación. Además, en casos graves pueden presentarse signos de carácter respiratorio como respiración superficial, disnea y tos húmeda, que pueden durar de 3 a 7 días. Los animales se recuperan progresivamente, continuando como portadores, y diseminando ocasionalmente la bacteria durante meses (Tanaka et al., 2010).



## I. Mecanismos de transmisión

La principal vía de transmisión de *Salmonella* es de tipo oral-fecal. Normalmente, los animales se contagian entre ellos a través del contacto con sus heces. Una vez que ingieren la bacteria, ésta coloniza el sistema gastrointestinal rápidamente, pudiendo estos animales recién infectados comenzar a diseminar el patógeno en heces el mismo día de infección (Hurd et al., 2002). Durante la fase aguda de infección (primera semana post-infección aproximadamente) *Salmonella* se excreta en concentraciones muy elevadas (entre  $10^5$  y  $10^8$  UFC/g) (Boughton et al., 2007). Esto facilita la diseminación en el ambiente y la infección de animales sanos, ya que en un corto periodo de tiempo se infecta una gran proporción de animales alojados en un mismo ambiente.

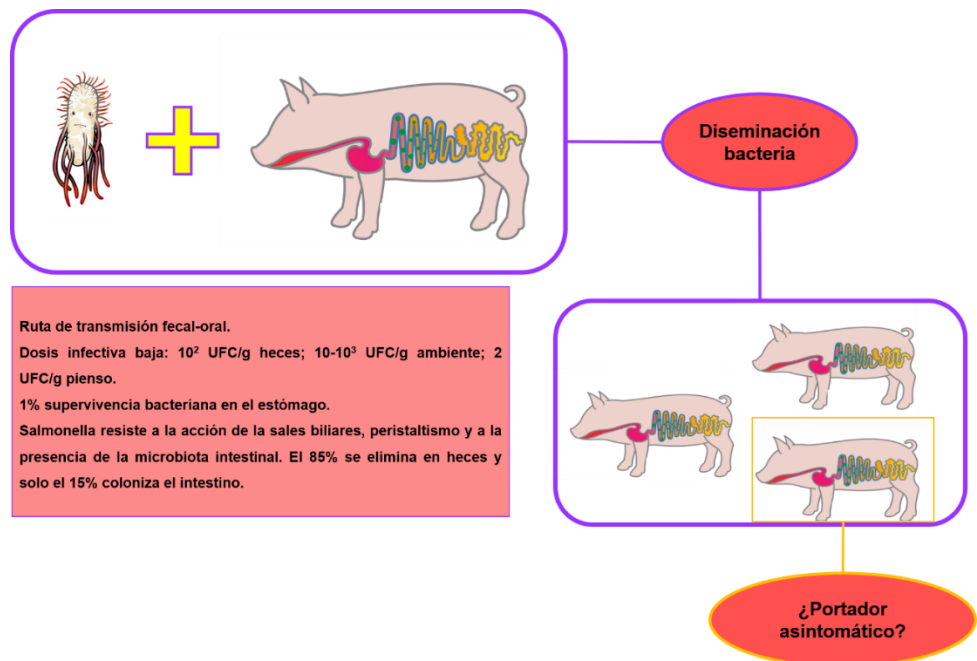


Figura 5. Esquema de la transmisión de *Salmonella* en el cerdo.

Una vez superada la fase aguda, la mayoría de estos animales seguirán eliminando *Salmonella* en heces de forma intermitente pasando a ser portadores asintomáticos del patógeno, con el riesgo potencial de reactivación de la infección y eliminación de *Salmonella* al ambiente (**Figura 5**). Numerosos estudios avalan la presencia de la bacteria fuera del sistema gastrointestinal (Fernandez-Santoscoy et al., 2015; Rieger et al., 2015). Las zonas donde está presente se definen como órganos reservorio, entre los que destacan tonsilas, ganglios linfáticos ileocecales y mesentéricos. Cuando los animales presentan este estado de portador, la diseminación de la bacteria en heces es nula o muy baja, lo cual dificulta en gran medida la posibilidad de detectar, mediante métodos directos (cultivo o PCR), la presencia de *Salmonella* en estos animales, motivo por el cual se utilizan métodos indirectos como la técnica ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas) para detectar anticuerpos que demuestren que el animal está infectado por el patógeno (Nielsen et al., 1995).

### ***II. Patogénesis de la infección en intestino***

El intestino delgado, formado por el duodeno, yeyuno e íleon, cumple muchas funciones importantes entre las que se encuentran la digestión, la absorción y transporte de nutrientes (agua y electrolitos) y sales biliares, así como la defensa inflamatoria e inmunológica contra agentes externos como, por ejemplo, bacterias (Goncalves et al., 2015). Las estructuras por las que está formado, principalmente pliegues, vellosidades y criptas, están destinadas funcionalmente al incremento de su superficie interna. Las vellosidades, que forman los pliegues, son proyecciones digitiformes de la mucosa. Las criptas se sitúan en la base de las vellosidades y, formando parte del borde apical de los enterocitos, se encuentran las microvellosidades (Cho, 2008) (**Figura 6**).

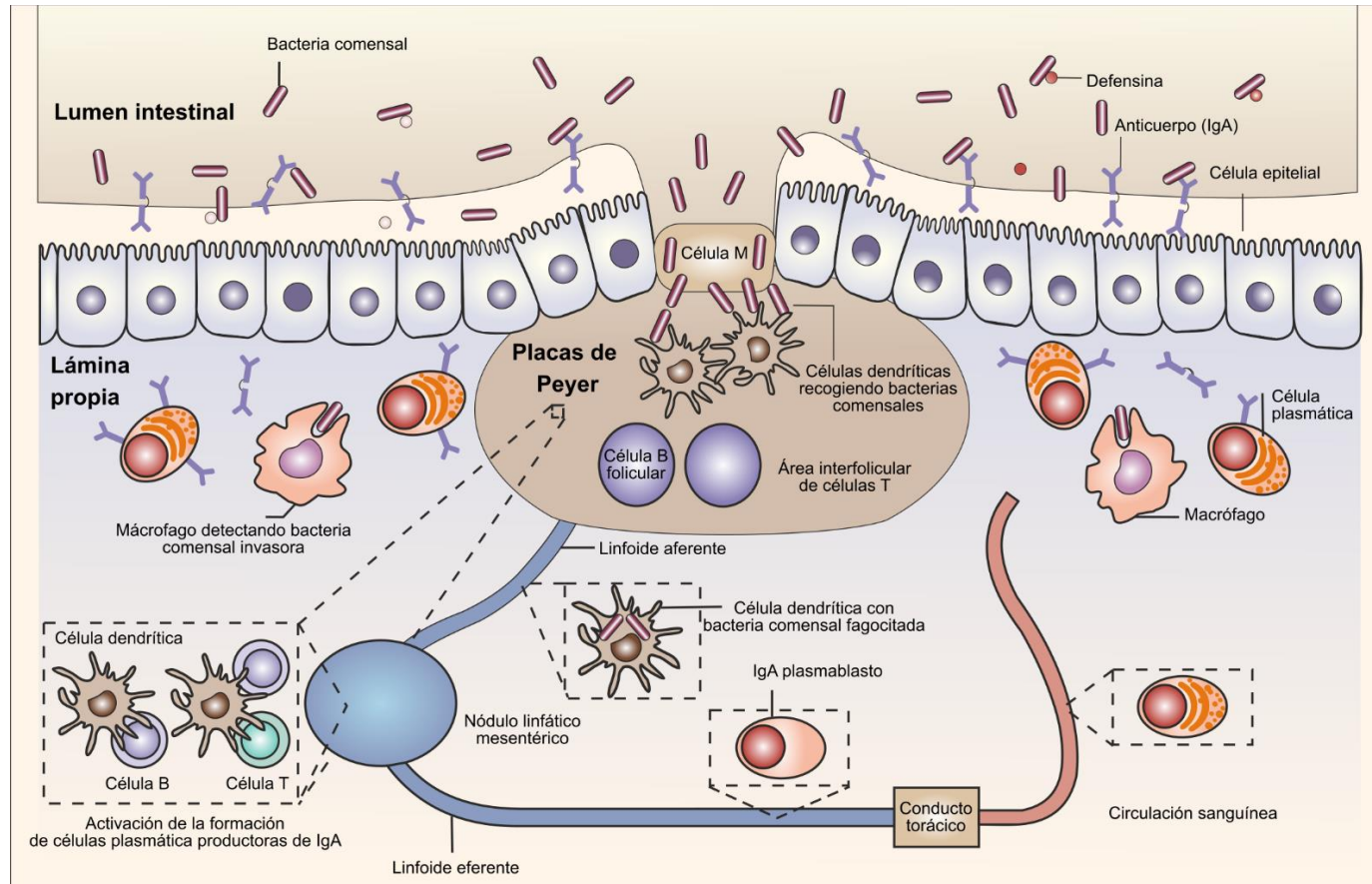


Figura 6. Esquema del tejido linfático asociado al intestino. Figura adaptada a partir de (Macpherson and Harris, 2019)

Formando parte del intestino existe una barrera de tipo epitelial que separa el contenido luminal del ambiente interno subyacente y el tejido linfoide asociado al intestino (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT). Dicha barrera es permeable, lo cual permite la absorción de moléculas de diferentes tamaños mediante el uso de diversos mecanismos de transporte (Cho, 2008). Dicha mucosa intestinal está compuesta por diferentes tipos celulares, como los enterocitos, las células caliciformes, productoras de mucina, las células de Paneth, directamente implicadas en la secreción de péptidos antimicrobianos, y las células M, implicadas en la captación de partículas por endocitosis (por ejemplo, antígenos bacterianos), entre otras. Además, al mismo tiempo tolera otros microbios “residentes” importantes para el metabolismo de nutrientes. Todos estos tipos celulares difieren significativamente en su perfil y función transcripcional, y muy probablemente también en su interacción con los patógenos entéricos (Cho, 2008). En resumen, la monocapa epitelial intestinal proporciona barreras intrínsecas y extrínsecas a los patógenos y antígenos potencialmente dañinos. Sin embargo, estos patógenos tienen mecanismos para eludir esta barrera física. Además, las células M y las células dendríticas pueden hacer contacto directamente con el patógeno, ya que, en el caso de las dendríticas, pueden separar uniones estrechas entre las células epiteliales para extender las dendritas a la luz intestinal (Ge et al., 2019). Ciertas especies de bacterias, como por ejemplo *Salmonella*, superan la barrera epitelial mediante el uso de estrategias de invasión especializadas, como el uso del sistema de secreción tipo III (Hapfelmeier et al., 2005; Laughlin et al., 2014). Pero los patógenos no solo se encuentran como barrera de defensa el epitelio intestinal, sino que también interactúan con las células fagocíticas, por ejemplo, macrófagos y neutrófilos, así como con los linfocitos B y T dentro del GALT. Estas interacciones proporcionan las señales necesarias para el inicio de una respuesta inmune adaptativa y la

generación de mecanismos efectores que frenen la infección (Wells et al., 2010).

Además de la barrera física que proporcionan, las células epiteliales intestinales, se consideran parte del sistema inmune innato. Por lo tanto, el epitelio intestinal tiene receptores evolucionados, como los TLR extracelulares y los NLR (receptores tipo NOD) intracelulares, para identificar los patógenos que han pasado la barrera epitelial. Esto provoca la activación de cascadas de señalización que regulan la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias que conducen al reclutamiento de macrófagos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares (Wells et al., 2010).

El intestino delgado contiene acúmulos de células linfoides conocidos como placas de Peyer (PP), que se definen como agregados linfoides macroscópicos que se encuentran en la submucosa a lo largo del intestino delgado, predominantemente en la zona del íleon. Estos agregados pueden estar formados por folículos de células B y T en distintos grados de maduración. Las células B inmaduras del centro germinal del folículo están soportadas o conectadas por células dendríticas foliculares. Estas células dendríticas foliculares presentan antígenos a las células T inmaduras (Reboldi and Cyster, 2016). La principal diferencia entre las PP y los Nódulos Linfáticos (NL), aparte de su localización, es que las primeras carecen de vasos linfáticos aferentes. Esta característica está de acuerdo con la noción de que el antígeno se recibe desde la luz del epitelio intestinal (Reboldi and Cyster, 2016).

Las PP están constituidas por 3 regiones claramente diferenciadas. La cúpula es la región más próxima a la luz intestinal y en la cual no hay criptas ni vellosidades. Las células especializadas presentes en esta zona son, predominantemente, las células M y células epiteliales. Bajo esta capa se

establece un entramado celular compuesto por células dendríticas, macrófagos y linfocitos T, en su mayoría. Las numerosas prolongaciones de las células dendríticas toman contacto con los antígenos actuando como células presentadoras frente a los linfocitos T (**Figura 6**). La segunda región está formada por los folículos linfoides compuestos por linfocitos B y T. La tercera región, denominada área interfolicular, se sitúa separando los folículos linfoides y en ella predomina la presencia de linfocitos T (**Figura 6**). Estos linfocitos se convierten en células de memoria o células efectoras (Xu et al., 2019) y migran desde las PP hacia los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), para, posteriormente, dirigirse a través del conducto torácico a la sangre periférica para su posterior diapédesis en los sitios efectores de la mucosa (Hampton et al., 2015).

La mayoría de las infecciones por *Salmonella* generalmente se adquieren por ingestión oral de alimentos o agua contaminados, donde la bacteria es capaz de sobrevivir a la acidez gástrica para acceder al epitelio intestinal. Este hecho provoca cambios inflamatorios en el epitelio intestinal, incluyendo la infiltración de neutrófilos y líquido en la luz intestinal, lo que resulta en un estado de diarrea inflamatoria (Harris et al., 1972). La infección provoca una reacción inflamatoria que resulta esencial para la liberación de factores, como, por ejemplo, el tetratonato, que pueden ser utilizados como fuentes nutricionales por *Salmonella*, proporcionando al patógeno una ventaja de crecimiento sobre la microbiota intestinal (Stecher et al., 2007; Winter et al., 2010). Otra consecuencia de la respuesta inflamatoria es que *Salmonella* puede ser fagocitada en la luz intestinal, facilitando la invasión de la mucosa intestinal (Jones et al., 1994). Además, la bacteria puede inducir su propia absorción por las células epiteliales, aunque la zona que generalmente usa para atravesar la barrera epitelial es a través de las células M, situadas junto a los tejidos linfoides intestinales conocidos como PP (**Figura 6**) (Martinez-Moya et al., 1998; Niedergang et al., 2000).

*Salmonella* puede invadir y sobrevivir dentro de varios tipos celulares, incluidos los fagocitos. La adaptación al ambiente intracelular permite a la bacteria sobrevivir dentro de las células epiteliales y los macrófagos evitando la degradación mediada por la propia célula. La supervivencia intracelular requiere que las bacterias reconozcan y resistan los componentes del sistema inmune innato, incluidos los péptidos antimicrobianos catiónicos y el pH ácido de la vacuola fagocítica (Dalebroux and Miller, 2014). El reconocimiento de la inmunidad innata del hospedador resulta en la activación transcripcional de genes que son importantes para la remodelación de la superficie celular bacteriana, lo que promueve la supervivencia intracelular. La detección del entorno intracelular y la posterior remodelación de la membrana bacteriana dependen de las proteínas reguladoras, incluidos los sistemas de dos componentes, por ejemplo, PhoP – PhoQ, entre otros (Dalebroux and Miller, 2014; Haraga et al., 2008).

La patogénesis de *S. Typhimurium* también depende, en gran medida, de dos sistemas distintos de secreción de tipo III (T3SS) que están codificados en las SPI-1 y SPI-2, que se encargan del transporte de proteínas efectoras al citoplasma del hospedador (Haraga et al., 2008). Estos efectores van dirigidos a dianas de la célula hospedadora para promover la invasión y la supervivencia intracelular de la bacteria. Algunos de los cambios provocados por dichos efectores son, por ejemplo, la reorganización del citoesqueleto de actina y la inducción de macropinocitosis para promover la absorción bacteriana en las células no fagocíticas (Alpuche-Aranda et al., 1994). Dicha captación de *Salmonella* se produce rápidamente, de manera que las bacterias inicialmente quedan encerradas en un compartimento fagosómico, que se somete a un proceso de maduración para formar un compartimento único que se conoce como SCV. La bacteria modifica el contenido de lípidos y proteínas de la SCV induciendo cambios

morfológicos que incluyen la polimerización de actina asociada a la membrana citosólica y la tubulación endosómica de la membrana vacuolar, utilizando los efectores de la SPI-2 (Haraga et al., 2008). Aunque se conocen algunos de los factores del hospedador que son manipulados por los efectores de *Salmonella* liberados del SCV, muchas de las dianas que se ven afectadas por dichos efectores aún no se han descubierto. Además, los efectores pueden tener múltiples dianas lo que complica la identificación de sus funciones específicas (Haraga et al., 2008).

### ***III. Patogénesis de la infección en nódulo linfático***

Los NLMs juegan un papel muy importante en la defensa inmune contra patógenos bacterianos (Hampton et al., 2015). Los NLMs están formados por una zona periférica o corteza externa, la corteza interna, el cordón medular y los senos linfáticos marginales, corticales y medulares (**Figura 7 A**).



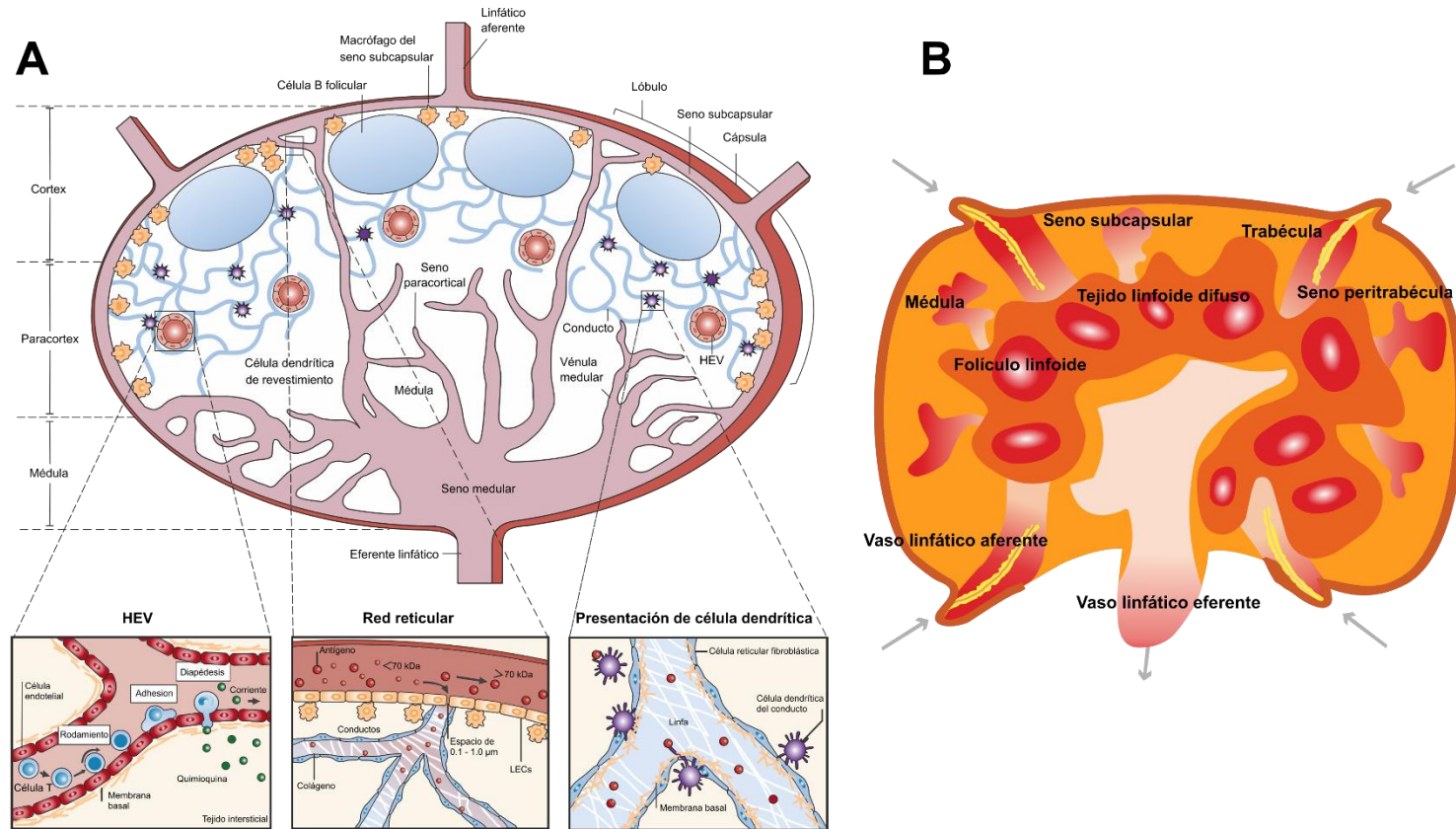


Figura 7. Esquema de la estructura del nódulo linfático y las rutas de tráfico celular, de las células B y T. A: Estructura NLM humano. B: Estructura NLM porcino. Figuras adaptadas a partir de (Schudel et al., 2019; Sánchez-Vizcaíno, 2010).

La región cortical está compuesta por folículos primarios de células B vírgenes, densamente empaquetados, y células dendríticas foliculares, rodeadas por el área interfolicular (Schudel et al., 2019). Tras el estímulo antigénico, las células B activadas proliferan dando lugar a folículos secundarios y centros germinales (Hampton et al., 2015). En la corteza interna se encuentran las células T, donde también están presentes las células dendríticas. En el cordón medular están presentes las células B, mientras que los senos linfáticos están poblados por macrófagos (Schudel et al., 2019). El contenido linfático y celular recolectado ingresa al ganglio linfático a través de los vasos linfáticos aferentes y filtra el nodo a través de los senos linfáticos en la médula o se mueve a través del seno subcapsular para salir a través de los vasos linfáticos eferentes. Las células y los antígenos también ingresan al ganglio linfático a través de una arteriola, que se ramifica en un lecho capilar (**Figura 7 A**) (Schudel et al., 2019). En cerdo, los ganglios linfáticos muestran algunas peculiaridades en comparación con otros animales. Tanto los ganglios linfáticos periféricos como los asociados a la mucosa tienen una estructura específica denominada “invertida” y están compuestos principalmente de córtex y paracórtex, careciendo de un área medular más grande (**Figura 7 B**) (Binns and Pabst, 1994; Skallerup et al., 2017). El tráfico de linfocitos en el cerdo también difiere del de otros animales. Mientras que la mayoría de las estructuras de los ganglios linfáticos permiten que los linfocitos salgan a través de los conductos eferentes hacia el conducto torácico, la elevada densidad de la médula externa en la estructura invertida impide la salida de los linfocitos a través de la linfa. En cambio, los linfocitos abandonan el ganglio linfático a través de las vénulas endoteliales, provocando un transporte de la linfa, en gran parte acelular, hacia el conducto torácico de los cerdos (Binns and Pabst, 1994).

*Salmonella* está descrita como un patógeno intracelular facultativo, desencadenando el inicio de la respuesta inmune adaptativa donde participan tanto células T como células B. Se ha descrito que la activación temprana de las células T-CD4<sup>+</sup> ocurre en las PP y se inicia durante las primeras horas tras la infección, donde posteriormente aparecen en los NLMS. (Martins et al., 2013c). Sin embargo, las células pertenecientes a la respuesta inmune innata tienen un papel crucial en el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Las bacterias entran en contacto con fagocitos durante el proceso de invasión del epitelio intestinal (Haraga et al., 2008). Las inmunoglobulinas específicas de *Salmonella* son producidas por las células B, las cuales pueden opsonizar las bacterias extracelulares para favorecer la absorción fagocítica (den Dunnen et al., 2012; Riquelme et al., 2012). Una vez dentro de estas células presentadoras de antígenos, el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) detecta la presencia de péptidos de carácter bacteriano. Cuando estos péptidos se unen al MHC se presentan en la superficie de las células presentadoras de antígenos para su posterior reconocimiento por los receptores de antígeno de las células T.

El desarrollo de la respuesta inmune de tipo CD4<sup>+</sup> frente a *Salmonella* ha sido descrita principalmente en el modelo de ratón (Mittrucker et al., 2002). Estos estudios sugieren que la producción masiva de células T-CD4<sup>+</sup> se debe a la señalización de citoquinas mediada por interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), IL2 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Además, otros estudios han demostrado que las citoquinas IL17 e IL22, asociadas a las células Th17, son secretadas a la mucosa intestinal después de la infección por *Salmonella* (Alvarez-Ordóñez et al., 2011; Baumler et al., 1998; Behnsen et al., 2015), lo que sugiere una importante contribución adicional de la respuesta Th17 frente a la infección. Además, estas citoquinas inducen la producción de péptidos antimicrobianos por las células del epitelio intestinal (Agbayani et al., 2017; Noto Llana et al., 2017). Además de la respuesta T-

CD4+, la infección por *Salmonella* también induce la respuesta de las células T-CD8+ (Mittrucker et al., 2002). Las células B activadas expresan citoquinas que parecen estar implicadas en la diferenciación y función de las células T-CD4+ promoviendo un cambio en la síntesis de inmunoglobulinas que permitan la activación de una respuesta de carácter citotóxico de células T-CD8+ y células fagocíticas como los macrófagos (Harris et al., 2000; Jiang et al., 2019). Generalmente, los péptidos de patógenos extracelulares, presentes en compartimentos citoplasmáticos, se presentan mediante la vía MHC de clase II. Sin embargo, los antígenos de las bacterias, como, por ejemplo, *E. coli* y *Salmonella* Typhimurium, los cuales actúan como patógenos intracelulares, se localizan en compartimentos creados mediante endofagocitosis dentro de células presentadoras de antígenos, y pueden presentarse de manera eficiente mediante la vía MHC de clase I (Alvarez-Ordóñez et al., 2011). Esta vía promueve una respuesta de células T-CD8+ dependientes de MHC de clase I. Dicho proceso se conoce en inglés como “cross-presentation” o presentación cruzada y requiere la translocación de péptidos desde los fagosomas al citosol para su procesamiento mediante el complejo del proteasoma (Albornoz et al., 2019; Jiang et al., 2019).

A pesar de que las respuestas inmunes, innata y adaptativa, se inician justo después de la infección por *Salmonella*, estas respuestas efectoras pueden verse obstaculizadas por las estrategias de evasión bacteriana. Se ha descrito que *Salmonella* es capaz de destruir tanto los macrófagos como las células dendríticas mediante un mecanismo denominado piroptosis (Fink and Cookson, 2007; Xia et al., 2019), impidiendo que dichos tipos celulares cumplan su función de presentación de antígenos y, de esta forma, bloqueando el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Además, *Salmonella* puede afectar el procesamiento del antígeno y los pasos de presentación en múltiples niveles para evitar la activación de las respuestas

de las células T. Sin embargo, los mecanismos por los cuales *Salmonella* evade eficazmente las respuestas inmunes primarias para generar infecciones, que pueden llegar a ser mortales, y que pueden ocurrir en una gran variedad de hospedadores animales, incluido el ser humano, son muy poco conocidos.

## **6. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PATÓGENO-HOSPEDADOR MEDIANTE DUAL RNA-SEQ**

La secuenciación de ARN de alto rendimiento (RNA-Seq) implica la secuenciación del conjunto completo de transcritos de ARN producidos por una célula en un momento definido en el tiempo (Garcia-Del Portillo and Pucciarelli, 2017; Naidoo et al., 2018). A diferencia de otros métodos como el uso de microarrays y estudios de proteómica y metabolómica, la tecnología RNA-Seq permite la definición del transcriptoma basado en métodos de secuenciación masiva de nueva generación que determinan la secuencia de ADN copia (ADNc), lo cual permite identificar casi en exclusiva y de manera cuantitativa secuencias codificantes que se están expresando en un momento dado (Garcia-Del Portillo and Pucciarelli, 2017; Saliba et al., 2017). Las principales características de esta técnica incluyen la ausencia de limitaciones respecto a la detección de transcritos que corresponden a un genoma secuenciado existente, la precisión de los datos obtenidos, bajos niveles de ruido de fondo y su coste relativamente bajo en comparación con los métodos transcriptómicos clásicos como el uso de microarrays o la secuenciación Sanger de ADNc (Garcia-Del Portillo and Pucciarelli, 2017). Conceptualmente, la secuenciación se realiza después de la conversión de una población de ARN (fraccionada o no para la

eliminación de especies ribosómicas o de ARNt muy abundantes) en una biblioteca de fragmentos de ADNc con adaptadores unidos a uno o ambos extremos, que posteriormente son secuenciados. Las lecturas obtenidas suelen ser de 30 a 400 pb, dependiendo de la tecnología de ADN empleada (Garcia-Del Portillo and Pucciarelli, 2017; Saliba et al., 2017). Esta técnica ha significado, en los últimos años, una revolución en la comprensión de los métodos de transcripción y regulación en organismos procariotas, incluyendo la importante contribución sobre la regulación génica y cómo los perfiles de expresión se forman a lo largo de los procesos de infección por patógenos bacterianos (Saliba et al., 2017). El proceso de infección normalmente implica un intercambio continuo de señales entre el patógeno y la célula infectada. Esta comunicación ha sido abordada por la llamada tecnología "dual" RNA-Seq.

Las diferentes especies de organismos no existen de forma aislada, sino que se relacionan entre sí, de manera que los eventos más interesantes en biología tienen lugar en las interacciones entre especies, que van desde el comensalismo hasta la patogénesis (**Figura 8**) (Naidoo et al., 2018; Wolf et al., 2018). Dichas interacciones requieren que ambos organismos respondan entre sí, a distintos niveles, incluida la regulación de su expresión génica. Para estudiar tales cambios de los transcriptomas, la secuenciación de ARN (RNA-Seq) se ha convertido en el método por excelencia. Una variante de esta técnica, denominada dual RNA-Seq, permite obtener simultáneamente el transcriptoma de dos (o más) organismos que estén interactuando, separando el ARN de ambas especies durante los análisis, evitando sesgos debido a los procedimientos de separación (Westermann et al., 2017; Wolf et al., 2018).

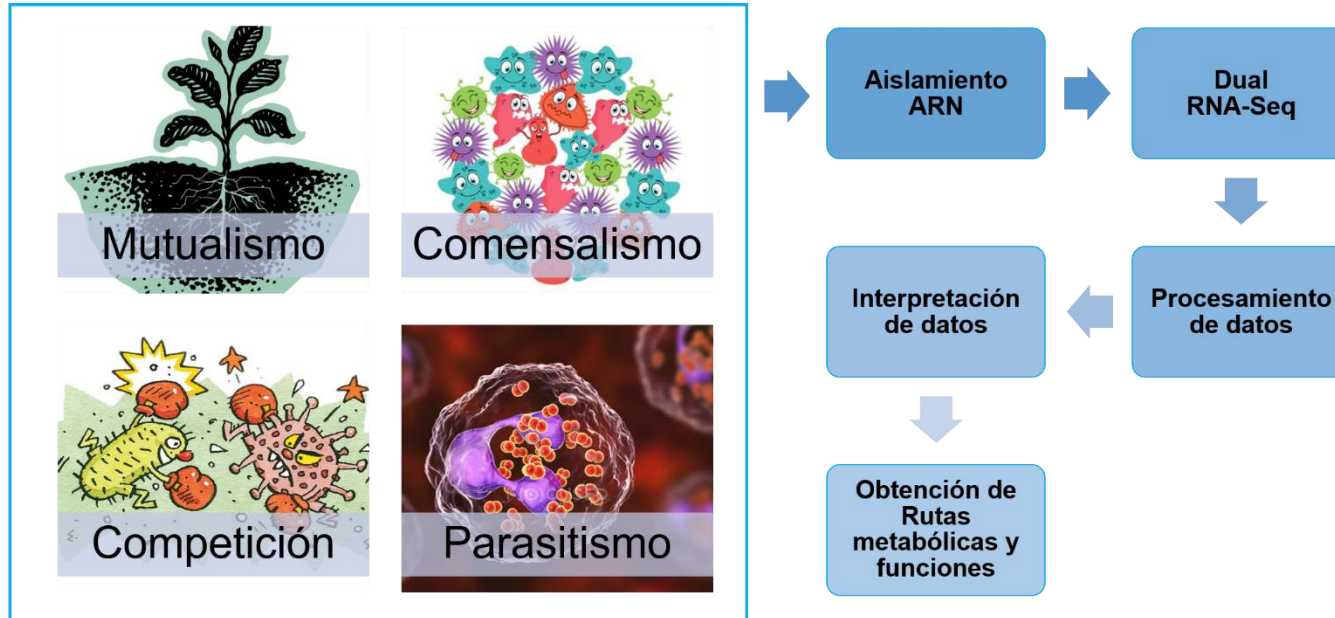


Figura 8. Aplicación de la técnica Dual RNA-Seq para diferentes tipos de interacciones entre especies. El ARN de las especies que interactúan se aísla y se secuencian sin separación física. Posteriormente, las lecturas sin procesar se analizan y se separan en el procesamiento de los datos.

Sin embargo, pese a todas las ventajas que ofrece esta técnica, también presenta limitaciones. Uno de los principales problemas de esta técnica es que los métodos de aislamiento tienen que adaptarse para ambos organismos, por ejemplo, debido a su pared celular o membrana de mayor grosor, el lisado de las células bacterianas y fúngicas es más difícil que la de las células de mamíferos (Wolf et al., 2018). Esto conlleva que el uso de tratamientos de aislamiento y purificación más agresivos puedan degradar el ARN de los mamíferos y distorsionar el estudio. Además, una limitación muy importante es el contenido de ARN por célula, el cual puede diferir enormemente entre las dos especies. Mientras que las células de mamíferos contienen aproximadamente de 20 a 25 pg de ARN, las células fúngicas contienen de 0.5 a 1pg y las bacterianas de 0.05 a 0.1pg, siendo estas últimas muy limitantes (Wolf et al., 2018). Por tanto, la cantidad de ARN bacteriano o fúngico es a menudo el factor limitante en los posteriores análisis transcripcionales. Actualmente, se han establecido diferentes métodos para superar este obstáculo, como el enriquecimiento de las especies de ARN limitantes antes de la secuenciación y la secuenciación de las bibliotecas de ADNc a una mayor profundidad (Westermann et al., 2017). Aun teniendo presentes estas limitaciones, los estudios de RNA-Seq se han convertido en una herramienta fundamental en análisis de expresión génica y constituyen el pilar central de la investigación realizada en esta tesis doctoral.



# Objetivos



El establecimiento de medidas de control eficientes que reduzcan la prevalencia de *Salmonella* en cerdos, principalmente el serotipo *S. Typhimurium*, es importante para disminuir la incidencia de esta zoonosis y para mejorar la sanidad animal. Para implementar nuevas estrategias de prevención es imprescindible determinar las interacciones patógeno-hospedador. Por ello, el **objetivo general** de esta tesis doctoral fue profundizar en el conocimiento de los mecanismos de infección de *Salmonella Typhimurium*, así como en la reacción del hospedador a dicha infección, sabiendo que, aunque las respuestas inmunes innata y adaptativa pueden controlarla, no eliminan la bacteria del hospedador. Nuestra **hipótesis** de trabajo está basada en la capacidad que presenta *Salmonella* en la modulación de la respuesta transcripcional en la mucosa de íleon y los NLMs para evadir la respuesta inmune del hospedador. Por ello se realizó secuenciación simultánea de patógeno y hospedador (Dual RNA-Seq) durante el proceso de infección. Los **objetivos específicos** fueron:

- 1- Realizar un estudio histológico, inmunohistoquímico y molecular de muestras de diferentes tramos del sistema gastrointestinal porcino y tejido linfoide asociado al intestino recogidas a diferentes tiempos (desde 1 día a 30 días post-infección) en una infección experimental *in vivo* con *S. Typhimurium*.
- 2- Analizar la respuesta inmune de la mucosa intestinal porcina (íleon) tras una infección experimental *in vivo* con *S. Typhimurium*, mediante un estudio transcriptómico simultáneo de hospedador y patógeno con dual RNA-Seq.
- 3- Analizar la respuesta inmune de células epiteliales intestinales porcinas (IPI-2I) tras una infección experimental *in vitro* con *S. Typhimurium*, mediante un estudio transcriptómico simultáneo de hospedador y patógeno con dual RNA-Seq.
- 4- Analizar el perfil transcripcional de los nódulos linfáticos mesentéricos tras una infección experimental *in vivo* con *S. Typhimurium*, evaluando la fase aguda (2 días post-infección) y la fase tardía (30 días post-infección) de la infección.



# **Materiales y Métodos**



## 1. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Para la consecución de esta tesis doctoral se utilizaron las muestras obtenidas en dos infecciones experimentales (que denominaremos Infección A e Infección B, de ahora en adelante). Las infecciones fueron realizadas en las instalaciones de aislamiento de la Universidad de León (España) en colaboración con la Dra. Ana Carvajal. Para cada infección se utilizaron un total de 16 cerdos (híbrido de Landrace x Large white) recién destetados (aproximadamente cuatro semanas de edad) procedentes de una granja libre de *Salmonella* (chequeo serológico rutinario). Todos los cerdos se asignaron en el mismo módulo de aislamiento, con una dieta *ad libitum* de pienso granulado libre de antibióticos y acceso a agua. La temperatura y la humedad del ambiente se controlaron y monitorizaron diariamente (alrededor de 28°C y 65% de humedad). Tras un periodo de aclimatación de 7 días se procedió al desafío de los animales. Dos horas antes de la infección, cuatro cerdos, elegidos al azar, fueron sacrificados (grupo de control). Los 12 cerdos restantes fueron desafiados por vía oral con 5 mL de caldo de cultivo (BHI, MERK) que contenía  $10^8$  UFC / mL de una cepa de *S. Typhimurium* del fagotipo DT104, aislada de cerdos con infección natural (aislado de campo) (Garcia-Feliz et al., 2007). En la Infección A, se sacrificaron cuatro cerdos por punto de tiempo con sacrificios a los 1, 2 y 6 días post-infección (d.p.i.). En la Infección B, también se sacrificaron 4 cerdos por punto de tiempo con necropsias a los 2, 14 y 30 d.p.i. Durante el período de estudio, los cerdos fueron monitorizados. De cada animal se recogieron datos de temperatura rectal y consistencia fecal (1: heces normales; 2: heces blandas; 3: diarrea acuosa; 4: diarrea con sangre), que fue evaluada en el momento de la obtención de heces mediante estimulación rectal para la detección de *Salmonella* (una

vez al día en la Infección A; cada dos días durante las dos primeras semanas, y cada tres días en las semanas tres y cuatro en la Infección B).

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con la normativa europea sobre protección de animales utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, y con la aprobación del Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de León, España.

## 2. RECOGIDA Y PROCESADO DE MUESTRAS

En referencia a las muestras de intestino, se cortaron tres secciones de 10 cm cada una de cada tramo intestinal: yeyuno (aproximadamente 80 cm desde la unión ileocecal), íleon (incluido el tejido cerca de la unión ileocecal), ciego y colon proximal (nuevamente tomando como referencia la unión ileocecal). Los ganglios linfáticos ileocecales (10 g) se obtuvieron cerca de la unión ileocecal. Los tejidos recogidos para el procesamiento histológico se fijaron inmediatamente en formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina. Las heces y los contenidos de diferentes segmentos del intestino (íleon, ciego y colon) se almacenaron a 4 °C para el análisis microbiológico, o se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80 °C para la obtención de ARN, ADN y cuantificación molecular de *Salmonella* (**Tabla 1**).



Tabla 1. Muestras recogidas de la infección experimental (Réplicas A y B). NLM: Nódulo Linfático Mesentérico.

| Grupo     | Infección Experimental | Día | Cerdo | Tejidos          |       |       |       |                 |          | Contenido |       |       |   | Heces | ARN   |     |
|-----------|------------------------|-----|-------|------------------|-------|-------|-------|-----------------|----------|-----------|-------|-------|---|-------|-------|-----|
|           |                        |     |       | Tramo Intestinal |       |       |       | Tejido Linfoide |          |           |       |       |   |       | Íleon | NLM |
| Control   | A                      | 0   | 1     | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 0   | 2     | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 0   | 3     | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 0   | 4     | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | B                      | 0   | 5     | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X | X     | X     |     |
|           | B                      | 0   | 6     | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X | X     | X     |     |
|           | B                      | 0   | 7     | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       |     |
| Infectado | B                      | 0   | 8     | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       |     |
|           | A                      | 1   | 9     | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 1   | 10    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 1   | 11    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 1   | 12    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 2   | 13    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 2   | 14    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 2   | 15    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | A                      | 2   | 16    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | -        | -         | -     | -     | - | -     |       |     |
|           | B                      | 2   | 21    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       | X   |
|           | B                      | 2   | 22    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X | X     | X     |     |
|           | B                      | 2   | 23    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X | X     |       |     |
|           | B                      | 2   | 24    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       |     |
|           | A                      | 6   | 17    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             |          |           |       |       |   |       |       |     |
|           | A                      | 6   | 18    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             |          |           |       |       |   |       |       |     |
|           | A                      | 6   | 19    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             |          |           |       |       |   |       |       |     |
|           | A                      | 6   | 20    | Yeyuno           | Íleon | Ciego | Colon | NLM             |          |           |       |       |   |       |       |     |
|           | B                      | 14  | 25    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       |     |
|           | B                      | 14  | 26    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       |     |
|           | B                      | 14  | 27    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       |     |
|           | B                      | 14  | 28    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       |     |
|           | B                      | 30  | 29    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       |     |
|           | B                      | 30  | 30    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       |     |
|           | B                      | 30  | 31    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       | X   |
|           | B                      | 30  | 32    | -                | Íleon | Ciego | Colon | NLM             | Tonsilas | Íleon     | Ciego | Colon | X |       |       | X   |

### 3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *SALMONELLA* EN HECES

La detección de *Salmonella* se realizó utilizando el Anexo D de la norma ISO-6579/2007 como se describió anteriormente (Arguello et al., 2013). Se partió de 10 g de heces frescas que fueron diluidas 1:10 en la etapa de pre-enriquecimiento del método. Además, un aislado por cultivo positivo fue caracterizado por serotipado utilizando el método de aglutinación en portaobjetos para confirmar la presencia de la cepa usada en la infección.

Para la cuantificación de *Salmonella*, se extrajo ADN a partir de 200 mg de heces congeladas y contenido de cada tramo intestinal utilizando TRIsure (Bioline) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de *Salmonella* en heces y en contenido de íleon, ciego y colon fueron realizados mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando sonda TaqMan qPCR (Martins et al., 2013b). La curva estándar fue preparada a partir del ADN de un caldo puro de la cepa de *Salmonella* y extraído utilizando el kit de tejido y sangre DNeasy (Qiagen). Posteriormente, se utilizaron concentraciones conocidas de  $1.0 \times 10^5$ ;  $5,0 \times 10^4$ ;  $1,0 \times 10^4$ ;  $5,0 \times 10^3$ ;  $1,0 \times 10^3$ ;  $5,0 \times 10^2$ ;  $1,0 \times 10^2$ ;  $5,0 \times 10^1$  y 0 equivalentes de genoma (GE) /  $\mu\text{L}$  de ADN para construir la curva estándar de referencia, en la cual, un equivalente de genoma de *S. Typhimurium* equivale a 5,46904 fg de ADN. La qPCR TaqMan fue realizada bajo las siguientes condiciones: 12,5  $\mu\text{L}$  IQ Supermix 2X (Biorad), 0,4  $\mu\text{M}$  de cada cebador (**Tabla 2**), 0,2  $\mu\text{M}$  sonda, 1  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  y 200 ng ADNg. Las condiciones de temperatura fueron 95 °C durante 10 min, 50 ciclos con 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores y sonda empleados en la PCR TaqMan para detección de *Salmonella*.

| Nombre                 | Secuencia                    |
|------------------------|------------------------------|
| Cebador Forward 19-mer | 5'-GCGCACCTCAACATCTTTC-3'    |
| Cebador Reverse 22-mer | 5'-GGTCAAATAACCCACGTTCA-3'   |
| Sonda                  | FAM ATCATCGTCGACATGC MGB/NFQ |

#### 4. BACTERIAS

Cepas de *Salmonella*: Las cepas utilizadas en este trabajo de Tesis podemos clasificarlas en 2 tipos:

- Cepa de *Salmonella* Typhimurium fagotipo DT104, aislada de un enfermo (aislado natural).
- *Salmonella* Typhimurium SL1344 procedente de una colección de cultivos tipo.

Todas las cepas fueron estriadas en Agar Soja-Triptona (TSA) (Oxoid Ltd) mediante siembra por agotamiento e incubadas durante 18-24 h a 37 °C.

La cepa receptora empleada en los experimentos de transformación genética para la amplificación de ADN plasmídico fue *Escherichia coli* XL1-Blue MRF-: con el genotipo  $\Delta(\text{mcrA})$  183,  $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$  173, end1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac\*F'proAB lacIq lacZ $\Delta$ M15, Tn10 (Tetr)+.

## 5. TÉCNICAS CELULARES

### *I. Mantenimiento de líneas celulares*

**IPI-2I:** La línea celular IPI-2I, procedente de epitelio intestinal de íleon porcino adulto, fue cultivada en medio DMEM/Ham's F:12 (1:1) (Life Technologies) suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories) y 4mM de L-glutamina (Life Technologies).

**THP1:** La línea celular monocítica THP1, procedente de sangre periférica humana, fue cultivada en medio RPMI (Lonza) suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories) y 2mM de L-glutamina (Life Technologies).

**3D4/31:** La línea celular 3D4/31, derivada de macrófagos alveolares porcinos, fue cultivada en medio RPMI (Lonza) suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories), 2mM de L-glutamina (Life Technologies) y 1% aminoácidos no esenciales.

**B3Z:** Hibridoma de células T que reconoce específicamente el péptido OVA (257–264) (SIINFEKL) en el contexto de H-2Kb. Esta línea fue cultivada en medio RPMI (Lonza) suplementado con 10% de SFB (PAA Laboratories), 4 mM de L-glutamina (Life Technologies), 50 mM 2-βMercaptoetanol y 1 M HEPES.

Todas estas líneas celulares fueron mantenidas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>.

### *II. Congelación y descongelación*

Para la congelación, las células fueron tripsinizadas y centrifugadas durante 5 minutos a 60 g, siendo resuspendido el *pellet* en medio de congelación (90% SFB, PPA Labotatories GmbH, Austria; y 10% DMSO, Sigma). A

continuación, 1 mL de esta solución conteniendo el *pellet* celular fue congelado a -80 °C en un criocontenedor con isopropanol durante al menos dos horas y finalmente transferido a nitrógeno líquido para su almacenamiento.

Para la descongelación, eliminamos el DMSO mediante lavado en un tubo estéril con 10 mL de medio completo. A continuación, las células fueron resuspendidas a la concentración deseada y transferidas a una botella de cultivo para su posterior mantenimiento a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **III. Infección *in vitro***

Para asegurar la máxima reproducibilidad en los resultados, todas las infecciones se realizaron en el mismo pase de cultivo (tercer-cuarto pase) y una confluencia celular del 70-80%. Las células IPI-2I, fueron sembradas dos días antes de la infección en placas de cultivo de 6 pocillos (estudio transcriptómico) o 24 pocillos (ensayo de protección a la gentamicina y ELISA IL8).

A lo largo de la tesis se realizaron diferentes infecciones *in vitro*:

- Estudio en IPI-2I donde realizamos una infección con *Salmonella* Typhimurium DT104 para realizar el análisis transcriptómico RNA-Seq (capítulo 3).
- Estudio de validación en IPI-2I donde realizamos una infección con *Salmonella* Typhimurium SL1344 para realizar el estudio del proceso de autofagia (capítulo 3).
- Estudio de validación en THP-1 y 3D4/31 donde realizamos una infección con *Salmonella* Typhimurium SL1344-OVA para realizar el estudio de presentación antigénica (capítulo 4).

Cada ensayo de infección *in vitro* consistió en una incubación con la bacteria a una dosis de multiplicidad de infección de 10:1 (10 bacterias por cada célula) durante 1 h. Tras la incubación con la bacteria, la monocapa celular fue lavada tres veces con tampón fosfato salino (PBS 1X) con 40 µg/mL de gentamicina y cubierta con medio completo con 40 µg/mL de gentamicina. Finalmente, las muestras fueron procesadas de diferente modo según el objetivo del estudio.

En todos los casos, la bacteria fue sembrada por agotamiento, 48 horas antes de la infección, en placas de TSA. En el día previo de la infección, se seleccionó una colonia aislada del cultivo puro en TSA que fue transferida a medio líquido LB (Luria Beltrani) durante una noche a 37 °C en agitación. El crecimiento de la bacteria fue cuantificado mediante espectrofotometría ( $\lambda = 600\text{nm}$ ). Tras calcular la cantidad de bacteria necesaria para infectar cada uno de los pocillos, se eliminó el medio LB (mediante centrifugación a 970 *g* durante 2 minutos), se resuspendió en medio de cultivo completo de la línea celular a infectar y se añadió sobre la monocapa celular. El tiempo de incubación de la infección es de 1 hora a 37 °C. Después de esta incubación, se retiró el medio con bacteria y se añadió medio completo con 40 µg/mL de gentamicina y esperamos las 24 horas para la recogida de las muestras.

#### **IV. Ensayo de protección a la gentamicina**

El ensayo de protección a la gentamicina se llevó a cabo para cuantificar la invasión de la bacteria en la célula. Para ello, las células fueron dispuestas en placas de cultivo de 24 pocillos, y se infectaron como se indicó en el apartado de infección *in vitro*. Tras el periodo de incubación con la bacteria, la monocapa celular fue lavada con PBS 1X y tratada con medio de cultivo conteniendo 40 µg/mL de gentamicina (Duchefa-Biochemie). La

gentamicina es un antibiótico que no es capaz de penetrar en la célula, por tanto, las bacterias que hayan invadido las células quedan protegidas a la acción del antibiótico. Tras la incubación con dicho antibiótico, la monocapa celular fue lisada con una solución de tritón X-100 (*Boehringer Mannheim*) al 1%, rompiendo las células y liberando la bacteria. Seguidamente, diluciones seriadas de dicho lisado fueron sembradas en placas de TSA (*Oxoid*). Tras la incubación de las placas a 37°C durante una noche, se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonias resultantes (UFC).

De manera paralela, se cuantificó la presencia de *Salmonella* intracelular mediante PCR con sonda TaqMan. Para ello, se siguió el mismo procedimiento hasta el punto en el que sustituimos la lisis celular, por el sistema de lisado del kit Purelink Genomic DNA Kits (*Invitrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidas las muestras de ADN<sub>g</sub> realizamos la PCR TaqMan con las condiciones descritas en el apartado 3 “Detección y cuantificación de *Salmonella* en heces”.

### **V. Ensayo de inhibición de la ruta de autofagia**

Para este ensayo fue empleado el inhibidor de autofagia 3-metiladenina (3-MA) (*InvivoGen*). Para realizar este ensayo, las células epiteliales fueron cultivadas en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, una vez establecida la monocapa celular, se retiró el medio de los pocillos y se añadió medio de cultivo suplementado con 5 mM de 3-MA. Se realizó la incubación a 2 h, 6 h y 24 h. Para cuantificar la cantidad de bacteria en el ensayo de inhibición de la autofagia, las células fueron dispuestas en placas de cultivo de 96 pocillos, y se infectaron como se indicó en el apartado de infección *in vitro* con una tinción previa de la bacteria con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*Sigma-Aldrich*). Tras el periodo de incubación con la bacteria, la

monocapa celular fue lavada con PBS 1X y tratada con medio de cultivo conteniendo 40 µg de gentamicina. Tras la incubación con dicho antibiótico, se realizaron 4 lavados con PBS 1X. Seguidamente, tras el último lavado, dejamos las células con PBS 1X para hacer la lectura en el lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (Thermo-Scientific). La lectura se realizó con una longitud de onda de excitación de 475 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Los valores obtenidos se expresan en unidades relativas de fluorescencia (RFU).

### **VI. Ensayo de proliferación celular**

La modificación de la tasa de proliferación celular como consecuencia del inhibidor de autofagia 3-MA fue evaluada mediante el empleo del MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma). Las células vivas transforman el MTT en cristales de formazán mediante una deshidrogenasa mitocondrial, proceso que no es capaz de realizar la célula muerta y permite diferenciarlas.

Para realizar esta cuantificación, las células IPI-2I fueron cultivadas en una placa de 96 pocillos a una concentración de 15.000 células por pocillo un día antes del tratamiento. Al día siguiente realizamos la incubación con 3-MA a 37 °C durante 2 h, 6 h y 24 h. Tras cada punto las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X, e incubadas en 100 µL de medio de cultivo completo con 10 µL de MTT (5 mg/mL, Sigma) durante 4h a 37 °C. A continuación, se centrifugó la placa de cultivo a 25 g durante 3 minutos, y el medio de cultivo fue retirado. Los cristales de formazán en el interior celular fueron disueltos en 100 µL de DMSO durante 5 min en agitación y seguidamente la reacción fue cuantificada mediante medida de la absorbancia relativa de las muestras a  $\lambda = 545$  nm en un lector de microplacas multimodo VARIOSKAN LUX (Thermo-Scientific),



determinándose el porcentaje de proliferación en relación con el control negativo (células no tratadas).

### ***VII. Ensayo de fagocitosis***

La actividad fagocítica de la línea celular 3D4/31 y THP1 fue medida mediante un ensayo de fagocitosis, tomando neutrófilos porcinos como referencia. El aislamiento de neutrófilos fue realizado siguiendo el protocolo descrito por (Sanz-Santos et al., 2011). Para ello fueron cultivadas un total de 50.000 células por pocillo en placas de 48 pocillos, para obtener una confluencia del 80% al día siguiente. Las células fueron incubadas durante 5 horas con Fluoresbrite plain YG 1.0 micron Microspheres (Polysciences) estableciendo un ratio de 20:1 (20 partículas por cada célula). Pasado este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se tripsinizaron las células para posteriormente fijarlas con paraformaldehído al 4% (PFA-4%). Una vez fijadas se realizaron las medidas a una longitud de onda de excitación de 588 nm en un citómetro CyFlow Cube 6 (Sysmex Partec).

### ***VIII. Ensayo de presentación antigénica***

Los plásmidos empleados pCDNA3, pCDNA3-OVA y pCDNA3-KB fueron cedidos por el Dr. Rodrigo Prado Martins (Robin Fahraeus's laboratory, Inserm UMR1162, Université Paris 7, Institut de Génétique Moléculaire, 27 rue Juliette Dodu 75010 Paris, France). Cada plásmido fue transfectado individualmente en las células 3D4/31 a una concentración final de 500 ng de plásmido, utilizando el protocolo estándar de transfección. El reactivo de transfección *Viromer Plasmid* (Lipocalix) fue diluido en su correspondiente solución tampón y añadido a la preparación de los plásmidos. La mezcla resultante fue incubada 15 minutos a temperatura ambiente. Tras ello, la

mezcla resultante fue adicionada a 100.000 células (por pocillo) resuspendidas en su correspondiente medio de cultivo, sembradas en placas de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific) e incubadas a 37 °C en una atmosfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 48 horas, las células fueron despegadas y contadas para dispensar 100.000 células en pocillos de placas de 48 (Thermo Fisher Scientific). Seguidamente fueron infectadas con MOI 10:1 de “*Salmonella* Typhimurium OVA” (**ver sección 8. VIII**) y puestas en contacto con los inhibidores 3-MA (5 mM) (InvivoGen) y MG-132 (0,5 µM) (Sigma) en los puntos establecidos. Transcurrida la infección de 1 hora, las células son lavadas 3 veces con PBS 1X-gentamicina (70 µg/mL) y puestas en contacto con el hibridoma (células B3Z). Concretamente, añadimos a cada pocillo 100.000 células B3Z, para tener, aproximadamente, el mismo número de células de cada tipo celular. Tras 24 horas de co-incubación se recogieron los sobrenadantes de cada pocillo para medir los niveles de IL2 mediante ELISA.

## 6. HISTOPATOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

De cada tejido recolectado (**Tabla 1**) se prepararon secciones de 5 µm y se procesaron de forma rutinaria con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), se desparafinaron en xilol y se rehidrataron a través de alcoholes graduados en agua destilada. Los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-*Salmonella* cuya especificidad se determinó previamente, y un anticuerpo monoclonal de ratón específico para macrófagos porcinos (clon 4E9/11) (Bullido et al., 1997). Las reacciones de los anticuerpos se detectaron mediante un método estándar de avidina-biotina peroxidasa (Dako) utilizando diaminobenzidina (Sigma-

Aldrich) como sustrato cromógeno. Para evaluar la especificidad de cada reacción, se realizaron controles negativos (reacciones que carecen del anticuerpo primario) en paralelo para cada sección marcada. Después del sellado de las preparaciones con medio de montaje y la adquisición de imágenes, la carga de *Salmonella* se cuantificó empleando diez imágenes de cada preparación utilizando la herramienta “IHC profiler” del software ImageJ. Mediante el algoritmo de perfiles de IHC (inmunohistoquímica), que estima el número de píxeles positivos dentro de la imagen, se analizó cada imagen para cuantificar *Salmonella* y macrófagos. Los polimorfonucleares se enumeraron contando cada tipo de célula en 10 campos seleccionados al azar (campo 400x) de cada corte procesado.

## 7. MICROSCOPIA

### ***I. Microscopía electrónica de barrido***

Para poder llevar a cabo técnicas de microscopía, las células epiteliales fueron cultivadas sobre soporte de plástico específico para células adherentes. Tras la infección in vitro, las células fueron fijadas con 4 mL de doble fijador (2,5% glutaraldehído + 2% paraformaldehído en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,4) durante 5-12 horas. Se quitó el doble fijador y se realizó un lavado con 5 mL de cacodilato. Tras eso se hizo otro lavado con 5 mL PBS 1X. Posteriormente, se usó 1 mL de tripsina y se incubó 5 minutos a 37 °C. Se recogieron las células con medio de cultivo y se centrifugaron 5 min a 60 g. Se eliminó el medio, y fue realizado otro lavado con 5 mL de PBS 1X. Se centrifugaron nuevamente 5 min a 60 g y se eliminó el PBS 1X. Se realizó un último lavado de 5 mL de cacodilato 0,1 M, y se centrifugó 5 min a 60 g, volviendo a resuspender en cacodilato en un eppendorf de 1,5

mL. Se realizó una centrifugación de 5 min a 60 g que generó un pellet, al que se le realizaron 2 lavados con 1 mL de tampón cacodilato 0,1 M de 30 min cada uno. Para la post-fijación se usó una solución al 1% de OsO<sub>4</sub> en tampón cacodilato (1:1) durante 1h en oscuridad a 4 °C. El volumen necesario para cubrir el pellet fue de 125 µL aproximadamente. Se hicieron 2 lavados con 1 mL de tampón cacodilato 0,1 M de 30 min cada uno. El siguiente paso fue la deshidratación en serie creciente de EtOH (1 mL por eppendorf) (50%, 70%, 90%, 100% y 2 veces en 100% absoluto), 30-45 min en cada una y con absoluto 1-1,5 h. Tras esto, se lavaron 2 veces con óxido de propileno (100%) con 1 mL por eppendorf durante 30 min cada uno. Se necesitaron las siguientes diluciones con óxido de propileno:

Óxido de propileno – Resina Epoxi 2:1 → 2 h

Óxido de propileno – Resina Epoxi 1:1 → 2 h “Se puede quedar O/N”.

Óxido de propileno – Resina Epoxi 1:2 → 2 h – 6 h

Las incubaciones se hicieron a 4 °C y los gradientes de resina se prepararon frescos. La incubación de resina Epoxi (100%) se hizo O/N. Al día siguiente se puso resina Epoxi nueva y se polimerizaron en estufa a 65 °C durante 48-72 h. Posteriormente se realizó el montaje de las preparaciones, el cual fue llevado a cabo por la unidad de microscopía electrónica de barrido del SCAI (servicio centralizado de apoyo a la investigación) de la Universidad de Córdoba. Para la visualización de las muestras se usó el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6300 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan).

## **II. Microscopía confocal**

Previo a la infección, las células fueron cultivadas en un soporte de cristal tratado con Poli-L-Lisina durante 5 minutos a 37 °C. Antes de depositar las células se lavaron los cristales con PBS 1X para quitar el exceso. Antes de la infección *in vitro*, la bacteria fue marcada con FITC (Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo previamente descrito por Pathirana y colaboradores (Pathirana et al., 2007) con pequeñas modificaciones. Concretamente, 10<sup>8</sup> bacterias fueron incubadas a 37 °C en agitación y oscuridad en 1 ml de una solución de FITC 0,1 µg/µL durante 30 minutos, lavándose 3 veces con PBS 1X tras la incubación para eliminar el exceso de FITC. Después de la incubación de las células con la bacteria marcada, las muestras fueron lavadas con PBS 1X para eliminar la bacteria extracelular, y fijadas en una solución al 4% de paraformaldehído en PBS 1X durante 20 minutos. Tras la fijación y para favorecer el marcaje de los anticuerpos, las muestras fueron permeabilizadas con una solución de tritón X-100 (Boehringer Mannheim) al 0,1% en PBS 1X durante 5 minutos y a temperatura ambiente. Una vez permeabilizadas, fueron empleados los siguientes anticuerpos de autofagia, un primario denominado LC3B (D11) XP Rabbit mAb (Cell Signaling Technology) y un secundario denominado Goat Anti-Rabbit IgG HyL (Alexa Fluor 594) (Abcam). Para la tinción de los núcleos celulares, las muestras se trataron con una solución 0,5 µg/mL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Roche) durante 2 minutos. Por último, tras realizar 3 lavados con PBS 1X para eliminar el exceso de tinción, los soportes de cristal fueron montados sobre portaobjetos con un medio de montaje específico para muestras con fluorescencia (Dako).

Las muestras fueron visualizadas en un microscopio confocal láser de barrido LSM 5 EXCITER (Carl Zeiss, Jena, Germany) del “Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba” (IMIBIC) y analizadas usando el programa informático ImageJ (National Institutes of Health,

Bethesda, USA). Para observar el eje Z completo (grosor de la célula desde la base hasta la zona apical) en una única imagen, todas las imágenes de un campo fueron convertidas en una única imagen mediante la herramienta “Z-project” del programa ImageJ. Además, la herramienta “analyze particles” fue empleada para el recuento de vesículas marcadas por el anticuerpo anti-LC3.

## 8. ÁCIDOS NUCLEICOS Y TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### ***I. Extracción de ARN total***

El ARN total de las muestras de mucosa y nódulo linfático, para secuenciación, fue aislado mediante el uso del kit comercial mirVana™ miRNA Isolation Kits (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN total de las muestras de la infección *in vitro*, para secuenciación, fue aislado mediante el uso de TRIsure (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para evitar la contaminación por ADN genómico, las muestras fueron tratadas con DNAsa “TURBO DNA-free™ Kit” (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad fue evaluada mediante Bioanalyzer 2.100 (Agilent) y la cantidad del ARN obtenido fue estimada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y espectrofotometría con NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

## **II. Retrotranscripción**

Un total de 1 µg de ARN o 500 ng de cada muestra fue retrotranscrito a ADNc mediante el sistema qScript cDNA synthesis kit (Quanta), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µL, que fue diluido tras la reacción 1:10 o 1:5 respectivamente.

La eficiencia de la reacción de retrotranscripción se estimó mediante la amplificación de un fragmento de 422 pb de la secuencia que codifica para la subunidad ribosómica 18S, cuyo ARN mensajero (ARNm) se encuentra muy conservado y se sintetiza de forma constitutiva en todos los tejidos. Los cebadores empleados tienen una T<sub>m</sub> de 57 °C y sus secuencias son 18S-F: 5'-GACTCAACACGGGAAACCTCAC-3' y 18S-R: 5'-GCTTATGACCCGCACTTACTGG - 3'.

## **III. PCR cuantitativa a tiempo real**

El análisis de expresión génica se llevó a cabo mediante la cuantificación relativa del transcrito en relación a la expresión del gen de referencia. En el caso del estudio de abundancia de ARNm los genes de referencia usados fueron β-Act, la Cy-A, *B2M*, *HPRT* y *RPL4* en las muestras porcinas. Todos los cebadores usados en PCR cuantitativa a tiempo real (*Real Time quantitative PCR*, q-PCR de ahora en adelante) se muestran en las **Tablas 3 y 4**.

La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un sistema QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 5 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 57 °C y 45 s a 72 °C. Los análisis de la curva de fusión se realizaron al final, para garantizar la especificidad de cada producto de PCR. Para la reacción de qPCR se empleó el kit Pyrotaq Eva green (Cultek) siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción de

PCR a tiempo real se realizó en un volumen final de 15  $\mu$ l, siendo 3  $\mu$ l de Pyrotaq Eva green mix (Cultek), 0,4  $\mu$ l de cada cebador (20 nM), 2  $\mu$ l de ADNc diluido y agua hasta alcanzar el volumen final.

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en duplicado en placa de 96 pocillos. De cada reacción se realizó una réplica técnica, con cDNA procedente de una reacción de síntesis diferente, para confirmar la reproducibilidad de los datos obtenidos. Cada placa contuvo 3 reacciones de calibración entre placas (*interplate calibrators*) para corregir posibles variaciones entre placas. Tras realizar la corrección con la eficiencia de los cebadores, los valores de expresión relativa fueron obtenidos siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001) usando el programa Genex 6.0 (MultiD). Se usaron varios genes de referencia para luego identificar mediante los algoritmos Normfinder o Genorm (incluidos en GenEx) los más estables en cada situación experimental.



Tabla 3. Lista de cebadores empleados en q-PCR para las muestras porcinas de íleon, IPI-2I y NLM.

| TIPO       | GEN         | Tª   | EFICIENCIA | CEBADOR SENTIDO             | CEBADOR ANTISENTIDO      |
|------------|-------------|------|------------|-----------------------------|--------------------------|
| REFERENCIA | β-Actina    | 57   | 101,00     | CAGGTCATCACCATCGGCAACG      | GACAGCACCGTGTGGCGTAGAGGT |
|            | Cy-A        | 57   | 100,00     | CCTGAACATACGGGTCCTG         | AACTGGGAACCGTTTGTGTTG    |
|            | B2M         | 58   | 101,00     | TCCGCCCCAGATTGAAATT         | TGCTCCGCGTTCATCTTCT      |
|            | RPL4        | 60   | 93,32      | CAGGCCAGGAATCACAAAAT        | TTTAACGCCAACAGCCTTCT     |
|            | HPRT        | 60   | 97,11      | TGGTAGGCTATGCCCTTGAC        | GGGACTCCAGATGTTTCAA      |
| ESTUDIO    | ABCG8       | 58   | 106        | ACACTGCTGGGCCATATTTC        | AGGAGGACATGTGGAAGGTG     |
|            | APOA1       | 57   | 96,00      | GCAAGATGACCCGCAGTCACC       | GCCACTGTCTTTGATCGCATCC   |
|            | CCL20       | 54   | 100,00     | ACTTTGACTGCTGCCTCCGATA      | TGCATTGATGTCACAAGCTTCA   |
|            | CD209       | 60   | 99,00      | CTGACTTGGCCCCCTCCTTCT       | GAGACTGGTGGATCCTGGAAAC   |
|            | CJUN        | 57,7 | 102,00     | GGAAACGACCTTCTACGACGAT      | CAGGGTCATGCTCTGCTTCA     |
|            | CYP27A1     | 60   | 108,8      | GAAGAACCAGACGGATGCTC        | CTCCCTCTCACCTTGTCA       |
|            | CYP7A1      | 56,7 | 105        | TGCACAGAAAGCACTCATCC        | ACCAGTTCCGAGATGTGGTC     |
|            | EGR1        | 57   | 99,00      | ATCCCTGACTATCTGTTTCC        | CTGGTAGGTGGTGTGAG        |
|            | FABP6       | 59   | 100,00     | TGCGGATGGAGTCAAAGACA        | GTTCTCACAACCAAGTGTGCA    |
|            | FGFR4       | 60   | 96,4       | GGCTTTTGAGGTTCTGCTTG        | GGCCAGGACTTCTCTTGATG     |
|            | FOS         | 55,8 | 104,00     | AAAAGGAGAATCCGAAGGGAAA      | TGCAAAGCAGACTTCTCGTCTT   |
|            | FXR (NR1H4) | 60   | 80,00      | AAACTTCCGGCTGGACATAC        | TCAAGCAGTGGTTCCTGAAG     |
|            | IFN γ       | 57   | 108,60     | CAAAGCCATCAGTGAACATCA       | TCTCTGGCCTTGGAACATAGCT   |
|            | IL1a        | 57   | 93,00      | AACGAAGACGAACCCGTGTTGCT     | GGTCTCATCTTTGATGGTTTGG   |
|            | IRF9        | 60   | 98,4       | GGAGGACGAGGTTACCACAA        | CATTGGTCTCTGCCAACTCA     |
|            | NFκB2_TV2   | 60   | 96,7       | CTGGAGCCTCAAACCTGAAG        | GCACCTTGTACAAAAGCAGA     |
|            | PSMB9       | 61   | 94,00      | CCCTGCATCATCGAATCTACTG      | CGCTATGGCCTGAGCATCA      |
|            | SLC51A      | 58   | 104        | TTCTGCTGCTTTGGTCTCTG        | GGGTGTCCTTCAGTGTCTC      |
|            | SLC51B      | 60   | 96         | GCTTTGGTTTTACGCGTAG         | GTTTGCCTGGATGCTTCTC      |
|            | TLR-2       | 57   | 97,00      | TCACTTGTCTAACTTATCATCCTCTTG | TCAGCGAAGGTGTCATTATTGC   |
|            | TLR-4       | 57   | 99,00      | GCCATCGCTGCTAACATCATC       | CTCATACTCAAAGATACCATCGG  |
|            | TNFα_2      | 57   | 100,00     | CCTCTTCTCCTTCTCCTG          | CCTCGGCTTTGACATTGG       |
|            | STAT1       | 60   | 97,00      | TGGCACAGTGGCTAGAAAATCA      | GGTGGCAAACGAAACATCATT    |

Tabla 4. Lista de cebadores empleados en q-PCR para las muestras de Salmonella.

| TIPO       | GEN   | T <sup>a</sup> | EFICIENCIA | CEBADOR SENTIDO        | CEBADOR ANTISENTIDO      |
|------------|-------|----------------|------------|------------------------|--------------------------|
| REFERENCIA | rpoD  | 57             | 100,5      | GATGAAGATGCGGAAGAAGC   | CGACCGATTTTCAGACTCAACAC  |
|            | rpsO  | 59             | 96,8       | CCGGTTCTACCGATGTTTCAGG | CAGACCCAGACGCTCAATCAG    |
|            | rpsT  | 59             | 96,1       | CAAGCCGTCGCTCTATGATGC  | GTTGATCTGTGCAGTCAGGTTAGC |
| ESTUDIO    | avrA  | 57             | 97,5       | TGGTCGAGCTGGACATTCAA   | CGAGCGCCAGGCTAAAAATA     |
|            | sifA  | 59             | 100,5      | CCAGCACCAGCCAAAGTATGT  | GGCGTGAAAAACCTGATCAGA    |
|            | sopD2 | 59             | 108,8      | CGCTATACATGGGGGTATGG   | GCGGTCTTGTTGAGATGGAT     |
|            | sseJ  | 59             | 104,5      | ATGTTCCCGGGGCTAAAGAC   | TGGA CTTCCTGGGTTGGATG    |

#### ***IV. PCR convencional***

Para la amplificación de fragmentos de ADN se empleó la ADN polimerasa MyTaq (Bioline). La reacción de PCR presentó las siguientes condiciones de 5 µl de buffer 5x, 0,8 mM de cada cebador y 2 U de polimerasa, en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 1 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificación (95 °C 15 s, X °C 15 s y 72 °C durante 10 s), finalizando con una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

#### ***V. Preparación y secuenciación de las librerías para la técnica dual RNA-Seq***

La construcción de las librerías y la secuenciación de las muestras de ARN se realizaron en el Servicio de Genómica Funcional del Instituto de Investigación en Biomedicina (IRB) de Barcelona (Barcelona, España). Previamente fue realizado un control de calidad de las muestras, usando un Bioanalyzer 2.100 con el chip Expert-Eukaryote Total RNA Nano (Agilent Technologies) tomando como óptimos los datos de integridad del ARN (RNA integrity number, RIN) >7. Después del control de calidad se realizaron las librerías (Encore® Complete RNA-Seq DR Multiplex System - Nugen). Se llevaron a cabo otros controles de calidad (Bioanalyzer, 2.100 expert High Sensitivity DNA Assay) y cantidad (Qubit dsDNA HS) por parte del servicio de secuenciación después de crear las librerías. La plataforma de secuenciación empleada fue HiSeq2000 (Illumina Inc.) realizando una secuenciación single-end de 50 nucleótidos de longitud.

## **VI. *Análisis diferencial de expresión génica de los datos obtenidos de la técnica dual RNA-Seq***

El análisis bioinformático se llevó a cabo el centro de Supercomputación y Bioinnovación de la Universidad de Málaga. El flujo de trabajo se basa en una serie de paquetes de software adaptados al modelo experimental. Los componentes de nuestro análisis de RNA-Seq incluyen: SeqTrimNext (vs6), Bowtie2 (v.2.2.2), Samtools (v 0.1.19), DEgenes Hunter (v.2.0.11) y Full-Lengther-Next (v0.08). Las lecturas se sometieron a un riguroso control de calidad mediante SeqTrimNext (STN), un sistema empleado para preprocesamiento y limpieza de lecturas de múltiples plataformas de sistemas de secuenciación. STN elimina secuencias de baja calidad, secuencias de baja complejidad, elimina adaptadores de la técnica, colas polyA / polyT y secuencias contaminantes utilizando un BLAST personalizado contra diferentes bases de datos. Se utilizó Bowtie2 para alinear las lecturas con referencias genómicas o transcriptómicas, y Samtools, un paquete de programas para tratar directamente con archivos de alineación leyendo, escribiendo, editando o mostrando archivos de alineación en formato SAM/BAM. El resultado final fue una matriz de datos con cuantificación sobre transcripciones conocidas (lecturas mapeadas por transcripción).

En nuestro estudio empleamos el genoma del cerdo y el de *Salmonella* Typhimurium DT104 (cromosoma y plásmido) como referencias (Ensembl). El transcriptoma de referencia fue anotado contra humanos y ratones usando FLN (Full-Lengther-Next), ya que en ese momento el genoma del cerdo estaba pobremente anotado. FLN es capaz de clasificar y anotar los unigenes como si fueran de longitud completa, zonas-5', zonas-3' y zonas internas, sugiriendo además cuáles son desconocidos o conocidos y, en segundo lugar, qué proteínas conocidas codifican.

A continuación, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial mediante DEgenes Hunter, una herramienta diseñada para el cálculo de la expresión diferencial a partir del recuento de lecturas asignadas, como los niveles de expresión. Este proceso implica un cálculo del análisis de expresión diferencial relativa aplicando diferentes algoritmos, mediante paquetes de software específicos, de R (EdgeR y DESeq). Dado que la herramienta EdgeR pareció ser menos restrictiva y dio como resultado mayor número de genes diferencialmente expresados, se usaron estos resultados en mucosa de íleon, NLM, IPI-2I y *Salmonella*. En todos los casos se usó un umbral de valor de cambio (FC) absoluto mayor que 2, y valor P corregido por FDR < 0,05. La **Figura 1** muestra un diagrama del flujo de trabajo usado en el análisis bioinformático.

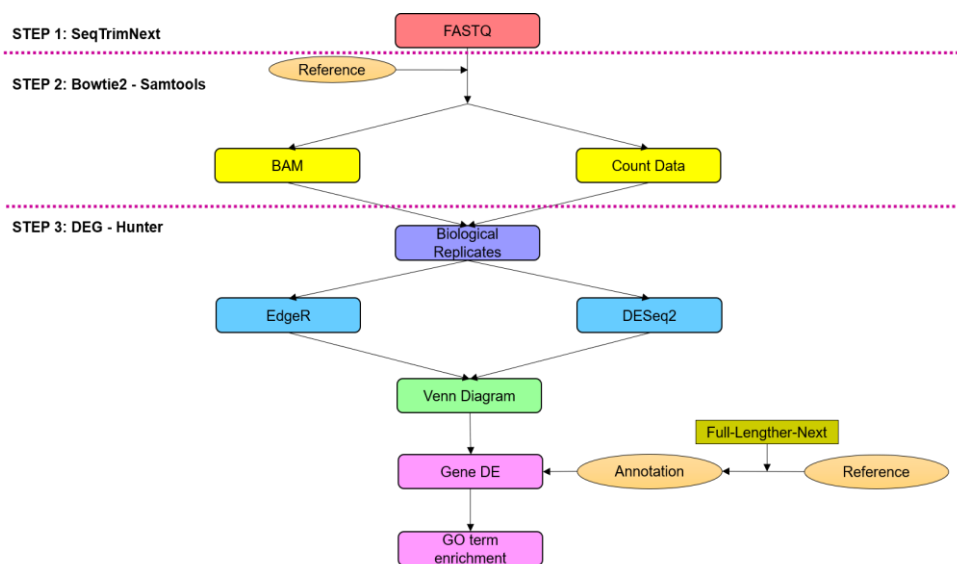


Figura 1. Pasos generales que se siguieron en el análisis de RNA-Seq para la detección de genes diferencialmente expresados.

## VII. Interpretación biológica de los datos obtenidos en el dual RNA-Seq.

Una vez que se obtuvieron los datos de secuenciación con los genes expresados diferencialmente, realizamos diferentes análisis para la bacteria y el hospedador. En el caso de la bacteria, el control usado para establecer la expresión diferencial fue *Salmonella* en condiciones de cultivo en medio LB a una  $DO_{600} = 0,3$ , cuyo ARN fue extraído usando el kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Tal y como indica la **Figura 2**, los análisis de bacteria y hospedador se hicieron por separado, partiendo de la herramienta común entre los 2 estudios “edgeR”.

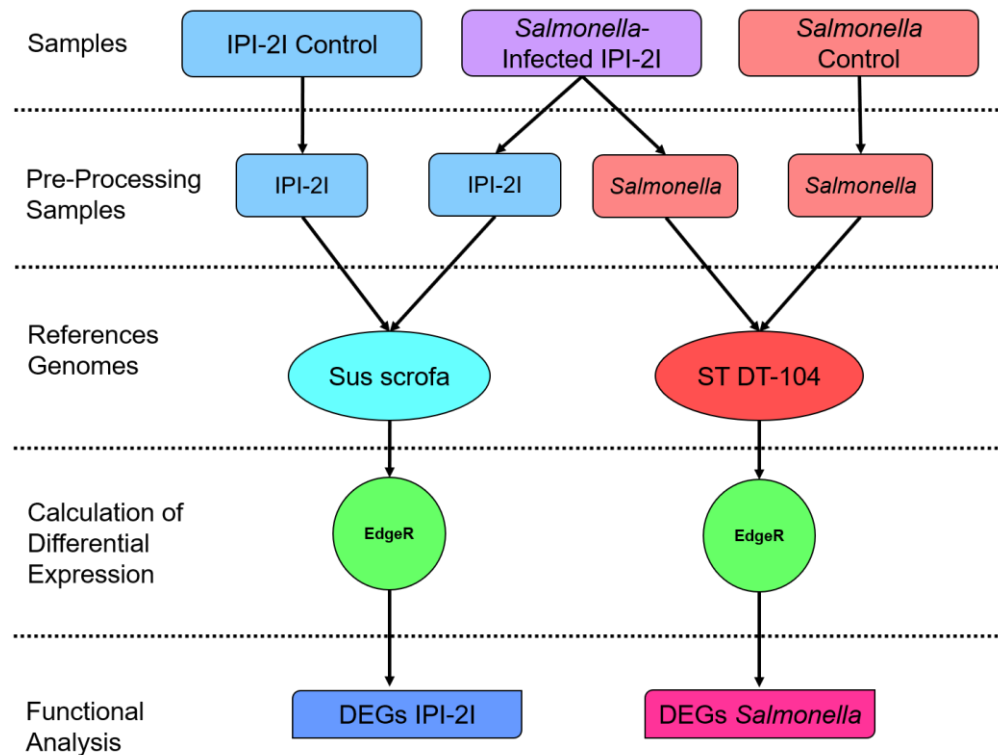


Figura 2. Flujo de trabajo empleado para las muestras del estudio dual RNA-Seq.

Las herramientas bioinformáticas empleadas para los análisis de funciones biológicas fueron Ingenuity Pathway Analysis de QIAGEN (IPA®, Qiagen Inc, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity)) para los genes relacionados con el hospedador, y para la bacteria fueron empleadas las siguientes: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) y PATRIC (pathosystems resource integration center).

### ***VIII. Expresión de la proteína OVA en Salmonella***

#### **DISEÑO DE CEBADORES**

En primer lugar, se diseñaron cebadores (**Tabla 5**) para la amplificación de OVA (Ovoalbúmina) de *Gallus gallus* (ENSGALT00000037195.2) mediante el uso del programa informático Oligo7 y primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

*Tabla 5. Cebadores usados para el diseño de la construcción en el vector pGEMT. Para pGEMT se muestra bases estabilizadoras en azul, codón de inicio de traducción en rojo y codón fin de mensaje en amarillo.*

| CEBADORES          | SECUENCIAS                    |
|--------------------|-------------------------------|
| <b>Ova-Forward</b> | 5'-CATGGGCTCCATCGGTGCAGCAA-3' |
| <b>Ova-Reverse</b> | 5'-TTAAGGGGAAACACATCTGCCA-3'  |

#### **LIGACIÓN**

El producto amplificado fue ligado en el vector pGEM-T mediante el sistema pGEM-T Easy Vector System (Promega), para verificar su secuencia. Las

ligaciones, para pGEMT, se realizaron en una reacción de 10  $\mu$ L incluyendo 1  $\mu$ L de T4 DNA ligasa, 5  $\mu$ L de tampón de ligación 2x, 1  $\mu$ L (50 ng) del vector pGEM-T Easy (ratio inserto:vector de 1:1). La reacción se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

### TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

El producto de ligación obtenido fue usado en la transformación bacteriana. Para ello, se emplearon bacterias de la estirpe XL1-Blue de *Escherichia coli*. La transformación se realizó mediante choque térmico, en presencia de una solución 1/10 de  $\beta$ -mercaptoetanol (1,8%  $\beta$ -mercaptoetanol más 98,2% de agua ultrapura). Las bacterias (50  $\mu$ L) fueron incubadas con 25 ng del vector durante 30 minutos en hielo, 3 minutos a 37 °C y 2 minutos finales en hielo. Seguidamente las bacterias se incubaron con 500  $\mu$ L de medio LB a 37 °C en agitación constante durante 1 hora, tras lo cual se sembraron en placas de LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado, en este caso 50  $\mu$ g/mL de ampicilina (Roche), y se dejaron crecer durante toda la noche a 37 °C.

### EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO: MINIPREP

Después de la transformación, las colonias bacterianas resultantes se cultivaron en 3 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche a 37 °C en agitación. Al día siguiente, los cultivos fueron centrifugados durante 2 minutos a 970 g y se descartó el sobrenadante. El *pellet* bacteriano se resuspendió en 200  $\mu$ L de tampón STET (Sacarosa 8%, Tritón 100x 0,1%, EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8) suplementado con 4  $\mu$ L de lisozima (50 mg/mL, Roche, Indianapolis, USA) para provocar la lisis celular. La muestra se incubó durante 10 minutos a temperatura



ambiente, se hirvió durante 45 segundos y se centrifugó durante 10 minutos a 970 *g*. Los restos celulares de aspecto mucoso se retiraron y se añadió al sobrenadante 8  $\mu$ L de la solución CTAB (bromuro hexadeciltrimetil amonio) al 5% para precipitar el ADN. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 970 *g* y se descartó el sobrenadante. El *pellet* fue resuspendido en 300  $\mu$ L de NaCl 1.2 M y 750  $\mu$ L de etanol puro frío mezclando por inversión. Se centrifugó durante 10 minutos a 970 *g*, se lavó el *pellet* con etanol al 70% y se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua ultrapura. Finalmente, se añadió 1  $\mu$ L de ARNasa (10 ng/ml, Roche) y se incubó 1 hora a 37 °C. La determinación de la concentración del plásmido aislado se realizó mediante espectrofotometría en *NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)* y se comprobó la presencia del inserto dentro del vector mediante digestión enzimática con la enzima EcoRI (Roche) y electroforesis en gel de agarosa (1%). Las secuencias fueron confirmadas mediante secuenciación en el servicio de secuenciación STAB vida de Portugal.

### TRANSFORMACIÓN DE *SALMONELLA* MEDIANTE ELECTROPORACIÓN

Tras verificar la secuencia de la construcción obtenida en el vector pGEMT, se procedió a realizar minipreps mediante el kit comercial Favorgen (Biotech Corp.) para obtener una elevada concentración del vector altamente purificada, evitando la presencia de restos salinos que interfieran en el proceso de electroporación. Una vez obtenida, se procedió a transformar la bacteria *Salmonella* Typhimurium SL1344 con la construcción. Para ello, previamente se preparó un cultivo de *Salmonella* que se dejó crecer hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0.8. Dicho cultivo fue centrifugado a 1.200 *g* a 4 °C. Seguidamente se realizaron 2 lavados en glicerol al 10% repitiendo las centrifugaciones en frío (4 °C). Finalmente, las bacterias se resuspendieron

en 2 – 3 mL de glicerol 10% para repartir alícuotas concentradas de 200  $\mu$ L. De esta forma las bacterias ya se encontraban en un estado competente favorable para la electroporación. Las cubetas empleadas fueron del tamaño 0,2 cm y en ellas fue añadido 40  $\mu$ L de bacterias competentes junto con 150 ng de la construcción. Los parámetros fijados en el electroporador GenePulser Xcell (Biorad) fueron 2,5 kV, 200 ohmios, 25  $\mu$ F. Una vez colocada la cubeta, se realizó la electroporación e, inmediatamente después se añadió 1 mL de medio LB para recuperar las bacterias electroporadas y ponerlas en cultivo en un eppendorf durante 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo las bacterias se sembraron en placas de LB-ampicilina durante 24 o 48 horas. Las colonias resultantes fueron también analizadas mediante secuenciación confirmando la presencia de la construcción en ellas.

## 9. PROTEÍNAS

### *I. ELISA Interleuquina 8*

El estado de activación de la respuesta proinflamatoria por parte de las células fue evaluado mediante la cuantificación de IL8 liberada al medio de cultivo. Para ello se empleó el Kit Swine IL8 ELISA VetSet (KingFisher Biotech) para muestras porcinas. El ensayo se realizó a partir de los sobrenadantes de la infección, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La lectura de las placas se llevó a cabo en un lector VARIOSKAN LUX (Thermo-Scientific), a una longitud de onda de 450 nm.

## ***II. ELISA Interleuquina 2***

El estado de activación de las células B3Z, en los ensayos de presentación antigénica, fue evaluado mediante la cuantificación de IL2 liberada al medio de cultivo. Para ello se empleó el Kit Mouse IL2 Uncoated ELISA (Invitrogen). El ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante y la lectura de las placas se llevó a cabo en un lector de placas VARIOSKAN LUX (Thermo-Scientific), a una longitud de onda de 450 nm.

## ***III. Extracción de proteínas a partir de líneas celulares***

Para la extracción de proteínas para análisis por western blot, las células fueron tratadas con tripsina, lavadas con PBS 1X y finalmente incubadas con una solución de lisis compuesta por Tris, NaCl, EDTA y NP40 (pH 7,4) en presencia de inhibidores de proteasas durante 1 hora a 4 °C en constante agitación. Tras ello, las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 970 *g* a 4 °C. El sobrenadante resultante fue usado para la cuantificación proteica mediante el método colorimétrico de Bradford (Kit Protein Assay, Bio-Rad). Tras la extracción y cuantificación proteica, las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

## ***IV. Western Blot***

Un total de 25 µg de cada muestra proteica fue separado electroforéticamente en un gel SDS-PAGE de acrilamida al 12 %. El gel fue electrotransferido a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore), la cual fue bloqueada con una solución al 5% de leche descremada en solución TBS-T. La incubación con el anticuerpo

primario LC3B Rabbit mAb (Cell Signalling Technology) se realizó a una dilución de 1/1.000 a 4 °C y durante toda la noche. A continuación, la membrana fue lavada 3 veces con TBS-T, para eliminar restos del anticuerpo primario, e incubada durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y diluido 1/10.000 (anticuerpo anti-conejo) y 1:5000 (anticuerpo anti-ratón). Tras los correspondientes lavados, la reacción fue revelada usando la solución de revelado quimioluminiscente Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). La membrana resultante fue visualizada en un equipo FujiFilm Luminescent Image Analyzer LAS-3.000.

## 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se introdujeron en R (R Project) para su análisis estadístico. En datos cuantitativos (temperatura rectal, recuentos de macrófagos, recuentos de neutrófilos y marcaje de *Salmonella*) se empleó la prueba de Shapiro-Wilk para comprobar su normalidad. Los valores de la temperatura rectal a lo largo del curso del estudio siguieron una distribución normal, por lo que las diferencias entre los grupos se establecieron mediante ANOVA de medidas repetidas, utilizando el cerdo como factor fijo. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con corrección post-hoc de Bonferroni se utilizó para estimar las diferencias en los recuentos de macrófagos, neutrófilos y marcaje de *Salmonella* entre las secciones intestinales y los puntos temporales de la necropsia. La significación del análisis estadístico se estableció en  $\alpha = 0,05$ .

Los resultados de expresión génica se calcularon usando el software GenEx5 Pro (MultiD), en base a los valores de CT obtenidos. Primero se comprobó la estabilidad de un conjunto de genes utilizando los softwares NormFinder y geNorm para usarlos como referencia del estudio (Andersen et al., 2004). Fueron seleccionados 5 genes referencia para cerdo y 3 genes para *Salmonella* (**Tablas 3 y 4**). Las relaciones de expresión se calcularon de acuerdo con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Las diferencias estadísticas en los valores de expresión génica entre grupos se evaluaron mediante una prueba de t de Student utilizando el software Graphpad Prism 6 (Graphpad Software Inc). La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

Para las distintas comparaciones entre muestras control y problema de los estudios de autofagia y presentación antigénica también fue empleado el software Graphpad Prism 6 realizando pruebas de t de student, estableciendo un valor de  $p < 0,05$ .



# Capítulo 1

## Infección por *Salmonella* *Typhimurium* a lo largo del tracto intestinal porcino y tejidos linfoides asociados

Bellido-Carreras N, Argüello H, Zaldívar-López S, Jiménez-Marín Á, Martins RP, Arce C, Morera L, Carvajal A, Garrido JJ. ***Salmonella* Typhimurium Infection Along the Porcine Gastrointestinal Tract and Associated Lymphoid Tissues.** *Vet Pathol.* 2019 Sep;56(5):681-690. doi: 10.1177/0300985819843682. Epub 2019 May 19. PMID: 31106677





# Resultados

## 1. SEGUIMIENTO DE LOS ANIMALES DURANTE LA INFECCIÓN

Con el objetivo de obtener un mayor conocimiento sobre la colonización intestinal, la diseminación de la bacteria en heces y la presencia del estado de portador en cerdos infectados, se diseñó el siguiente estudio para evaluar los cambios en el intestino y en el tejido linfoide asociado (tonsilas y NLMs) en un modelo de infección por *S. Typhimurium* en cerdo.

En primer lugar, fue analizada la progresión de la infección de *Salmonella Typhimurium* en diferentes tramos del intestino porcino y órganos linfoides asociados". Para ello se usaron parámetros y muestras procedentes de dos infecciones experimentales (ver Material y Métodos). Se realizó un seguimiento de las constantes vitales (temperatura) y se describió el grado de diarrea de cada uno de los cerdos incluidos en el estudio. En la **Figura 1** se resumen los datos de temperatura y clasificación de la diarrea en los cerdos monitorizados en las dos réplicas (A y B) realizadas en este estudio. Los animales presentaron temperaturas superiores a 40 °C durante los primeros días de infección en ambas réplicas (**Figuras 1 A y 1 B**), mientras que en el resto de los días de estudio la temperatura varió significativamente ( $p < 0,001$ ). Respecto a la eliminación en heces, las **Figuras 1 C y 1 D** muestran las valoraciones de la consistencia a lo largo de ambas pruebas.

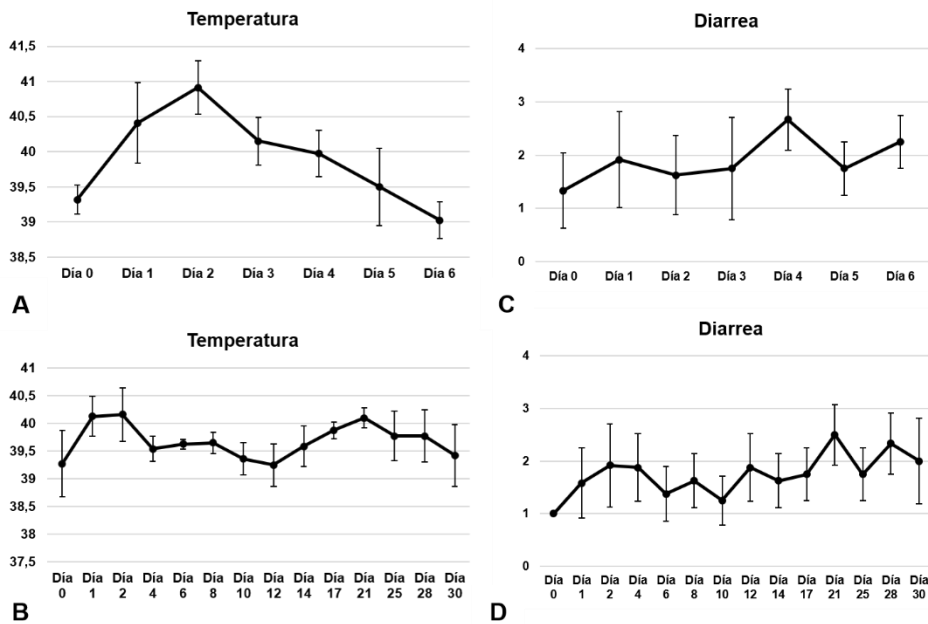


Figura 1. Efecto de la infección por *Salmonella Typhimurium* en cerdos. La temperatura rectal (1 A y 1 B) se controló desde el día 0 al día 6 en la réplica A y desde el día 0 al día 30 en la réplica B. Las muestras de heces (1 C y 1 D) se analizaron siguiendo el mismo patrón de tiempo que la temperatura. Las gráficas muestran la media y el error estándar de la media. Escala diarrea: 1-Heces normales; 2-Heces blandas; 3-Heces líquidas; 4-Presencia de sangre en heces.

## 2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *SALMONELLA* EN HECES Y DIFERENTES TRAMOS DEL INTESTINO

*Salmonella* fue cuantificada mediante qPCR con sonda TaqMan en las muestras obtenidas de contenido de íleon, ciego, colon y heces de la réplica B (Figura 2). De acuerdo a los datos obtenidos en la qPCR, la concentración más elevada de *Salmonella* en todos los tramos de intestino analizados fue detectada a 2 d.p.i. con aproximadamente  $10^5$  GE por gramo de heces (GE/g). Catorce días después, *Salmonella* solo fue detectada en muestras fecales ( $10^2$  GE/g), mientras que los valores obtenidos para el

contenido de las secciones de intestino analizadas se pueden considerar negativos. La concentración de *Salmonella* en las heces se mantuvo estable hasta el final del estudio, de acuerdo con los resultados observados en las heces de cerdos a 30 d.p.i. Así, en este punto, las muestras de contenido de íleon también fueron positivas con una concentración de *Salmonella* de  $10^2$  GE/g. A 30 d.p.i, las muestras de las secciones de intestino grueso (ciego y colon) fueron negativas.

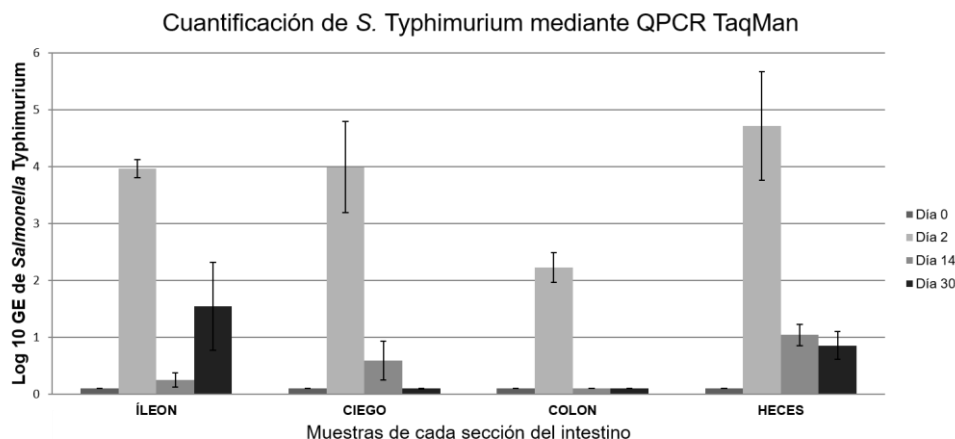
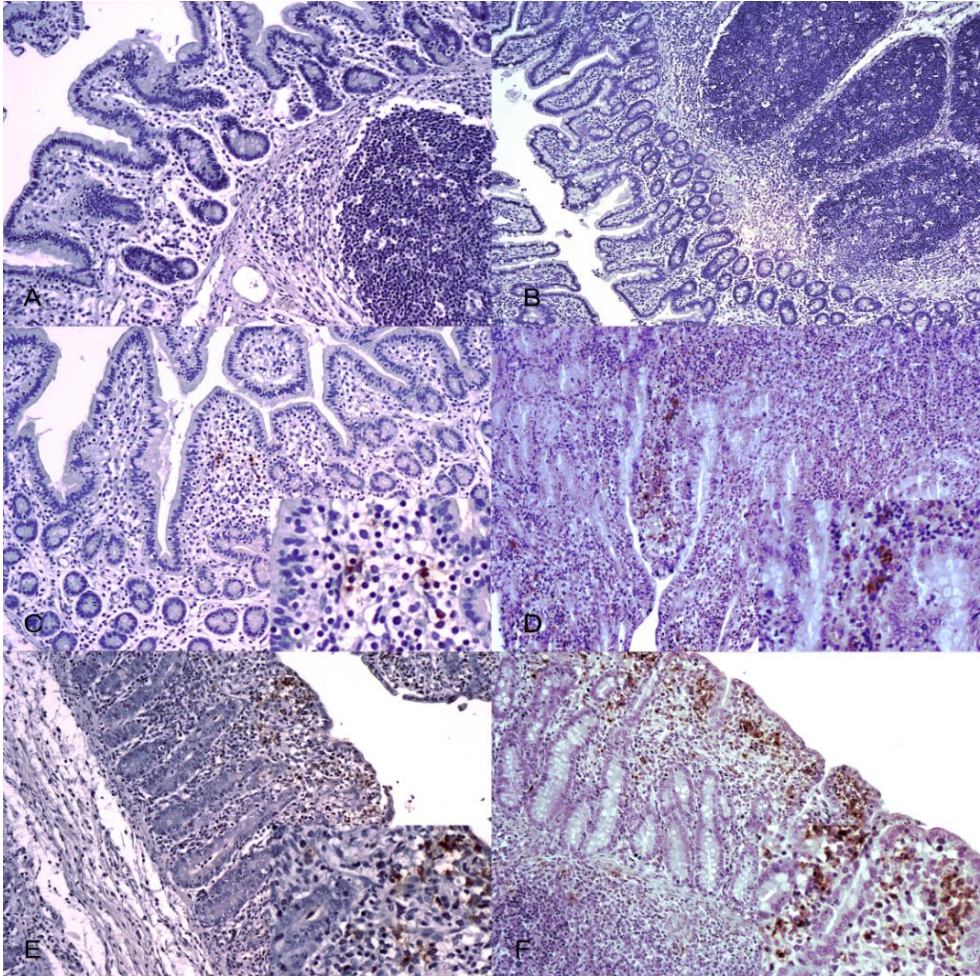


Figura 2. Cuantificación de *Salmonella Typhimurium* mediante qPCR TaqMan. Se realizó en el contenido de diferentes secciones del intestino a los diferentes tiempos de estudio. Se representa el  $\log_{10}$  de los equivalentes de genoma de cada muestra en las diferentes zonas del intestino y en los diferentes puntos de tiempo de la infección experimental. La concentración de *Salmonella* disminuye con el tiempo, pero el patógeno aún puede detectarse en el íleon y en las heces a los 30 d.p.i.

### 3. LOCALIZACIÓN DE *SALMONELLA* Y CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN EL INTESTINO

#### *I. Intestino Delgado:*

Las **Figuras 3 A y 3 B** corresponden a secciones histológicas de cerdos control en las que no se detectó *Salmonella*. El estudio histopatológico de las muestras reveló la reducción de la longitud de las vellosidades epiteliales en el intestino delgado (yeyuno e íleon) en cortes histológicos a 1 d.p.i. (**Figuras 3 C y 3 D**). La atrofia de las vellosidades fue completa a los 2 d.p.i., momento en el que se observa el mayor daño del epitelio intestinal (**Figuras 3 E y 3 F**). Se detectó *Salmonella* en la mucosa en el primer punto de estudio (24 horas post-infección) en los diferentes tramos intestinales evaluados. En la mucosa de íleon, se observó que la concentración de bacteria (determinada por el marcaje detectado) incrementó considerablemente a 2 d.p.i., comparado con el primer día post-infección ( $p = 0,025$ ), con una tendencia similar en el yeyuno ( $p = 0,054$ ), pero no en el colon ( $p = 0,121$ ). Así mismo, el marcaje de *Salmonella* fue significativamente mayor en el íleon, en comparación con las secciones de yeyuno y colon a los 2 d.p.i. ( $p < 0,001$ ). Concretamente en el íleon, la bacteria se distribuyó por todo el epitelio, penetrando desde las vellosidades dañadas a través de la mucosa hasta la submucosa, donde se podía observar marcaje de *Salmonella* en las PP. Finalmente, no se observaron diferencias en el marcaje de *Salmonella*, en la misma sección intestinal, entre los cerdos necropsiados en un mismo punto post-infección (**Tabla 1**).



*Figura 3. Infección temprana por Salmonella Typhimurium en los distintos tramos de intestino delgado a 0, 1 y 2 d.p.i. 3 A. Control yeyuno de día 0. 3 B. Control íleon de día 0. 3 C. Yeyuno, 1 d.p.i. Se observa la presencia del marcaje de S. Typhimurium (color marrón) dentro de las vellosidades. 3 D. Íleon, 1 d.p.i., Se observa atrofia de las vellosidades y S. Typhimurium presente en la mucosa. 3 E. Yeyuno, 2 d.p.i., se observa marcaje de la bacteria en la lámina propia. 3 F. Íleon, 2 d.p.i., el marcaje de la bacteria llega hasta la lámina propia.*

Tabla 1. Valores de cuantificación y profundidad de infiltración de *Salmonella* en la mucosa intestinal y nódulos linfáticos mesentéricos de cerdos sacrificados a 1, 2 y 6 d.p.i. Abreviaturas: C: Cuantificación; L: Localización; NLM: Nódulo Linfático Mesentérico.

| Cerdo            |        | DÍA 1 |   |      |   |     |   |      |   | DÍA 2 |   |      |   |      |   |      |   | DÍA 6 |   |     |   |     |   |     |   |
|------------------|--------|-------|---|------|---|-----|---|------|---|-------|---|------|---|------|---|------|---|-------|---|-----|---|-----|---|-----|---|
|                  |        | 9     |   | 10   |   | 11  |   | 12   |   | 13    |   | 14   |   | 15   |   | 16   |   | 17    |   | 18  |   | 19  |   | 20  |   |
|                  |        | C     | L | C    | L | C   | L | C    | L | C     | L | C    | L | C    | L | C    | L | C     | L | C   | L | C   | L | C   | L |
| Tramo Intestinal | Yeyuno | 2,5   | A | 3,1  | A | 3,5 | B | 4,4  | A | 21,6  | B | 21,5 | B | 23,9 | B | 1,2  | B | 1,3   | A | 2,6 | B | 0,7 | A | 0,4 | A |
|                  | Íleon  | 17,3  | B | 18,3 | B | 18  | B | 10,1 | B | 18,6  | B | 19,7 | C | 17,7 | B | 20,8 | C | 3     | A | 0,5 | A | 1,6 | A | 1,9 | A |
|                  | Colon  | 8,6   | A | 0,9  | A | 2,5 | A | 4,8  | A | 3,4   | A | 3,1  | A | 6,6  | A | 2,2  | A | 2,2   | A | 2,4 | A | 2,9 | A | 2,9 | A |
| NLM              |        | 3,5   | A | 1,2  | A | 0,5 | A | 0,8  | A | 12,6  | A | 8,5  | A | 14,6 | A | 4,8  | A | 1,7   | B | 2,1 | B | 1,5 | B | 1,4 | B |

C: Cuantificación del marcaje de *Salmonella* en diez imágenes para cada preparación mediante el uso del complemento de IHC Profiler en imageJ. Mostramos la media del porcentaje de píxeles positivos para el marcaje de cada animal. L: Localización de la bacteria dentro de la mucosa intestinal o en los nódulos linfáticos mesentéricos. En la mucosa: A = Cerca del epitelio; B = hasta la lámina propia de la mucosa; C = hasta la muscular de la mucosa. En los nódulos linfáticos mesentéricos: A = área medular; B = trabéculas.

Tabla 2. Valores de cuantificación de macrófagos y neutrófilos en la mucosa intestinal de yeyuno, íleon y colon en cerdos infectados con *S. Typhimurium* a 1, 2 y 6 d.p.i.

| Cerdo            |        | DÍA 1 |     |      |     |      |     |      |     | DÍA 2 |      |      |      |      |      |      |      | DÍA 6 |     |      |     |      |     |     |     |
|------------------|--------|-------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|
|                  |        | 9     |     | 10   |     | 11   |     | 12   |     | 13    |      | 14   |      | 15   |      | 16   |      | 17    |     | 18   |     | 19   |     | 20  |     |
|                  |        | M     | N   | M    | N   | M    | N   | M    | N   | M     | N    | M    | N    | M    | N    | M    | N    | M     | N   | M    | N   | M    | N   | M   | N   |
| Tramo intestinal | Yeyuno | 2,9   | 2,1 | 3,3  | 4,2 | 2,9  | 2,0 | 2,7  | 3,5 | 28,9  | 7,0  | 37,3 | 8,9  | 32,1 | 11,5 | 25,1 | 9,4  | 3,3   | 2,0 | 1,9  | 2,5 | 4,6  | 2,1 | 3,7 | 4,3 |
|                  | Íleon  | 63,1  | 4,8 | 56,8 | 4,1 | 53,7 | 6,9 | 61,1 | 6,7 | 90,8  | 18,8 | 85,1 | 17,1 | 92,5 | 17,5 | 80,8 | 20,3 | 5,6   | 2,7 | 6,9  | 3,8 | 15,6 | 2,1 | 8,3 | 5,6 |
|                  | Colon  | 17,1  | 4,1 | 17,9 | 5,0 | 22,0 | 5,9 | 18,2 | 3,2 | 60,3  | 9,2  | 70,2 | 11,6 | 59,9 | 11,0 | 51,7 | 8,9  | 6,7   | 2,6 | 11,6 | 4,1 | 6,1  | 3,8 | 7,1 | 4,7 |

Abreviaturas: M, Macrófagos; N, Neutrófilos.



## II. Intestino Grueso:

La evaluación de la presencia en el intestino grueso mediante inmunohistoquímica mostró menor marcaje comparado con el marcaje de *Salmonella* observado en las muestras de intestino delgado a 2 d.p.i. ( $p < 0,001$ ). Estos resultados son muy similares para el recuento de células inflamatorias (**Tabla 2**). Curiosamente, el daño en el epitelio del ciego y el colon fue menos grave (**Figuras 4 A y 4 B**), y la distribución de *Salmonella* se limitó a la zona más superficial de la mucosa en las muestras de ciego y colon (**Tabla 1**).

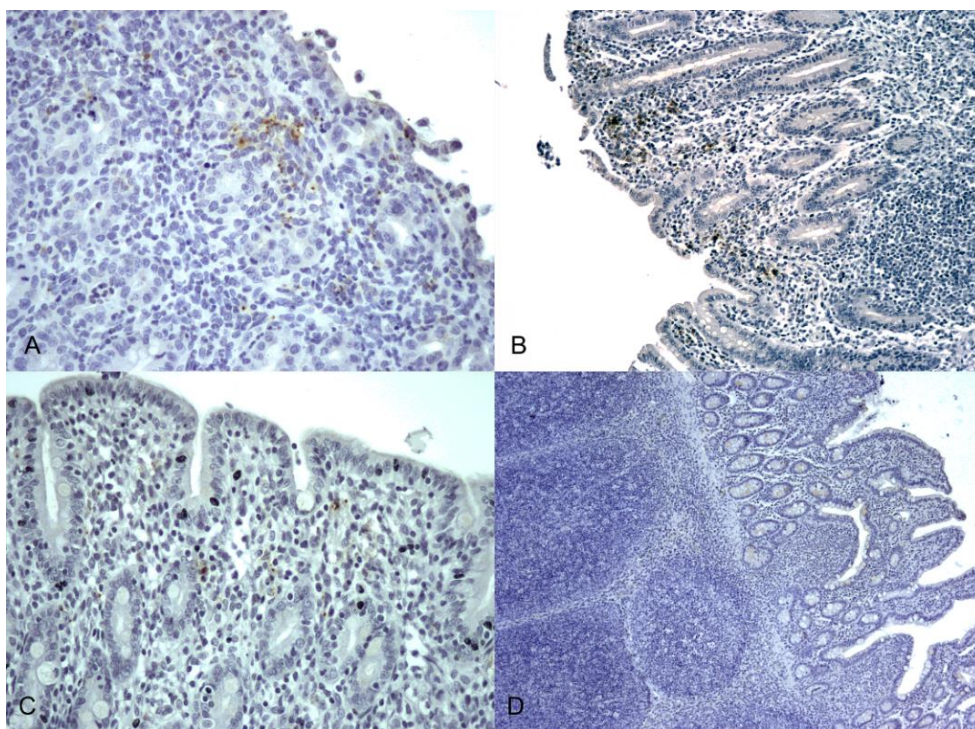


Figura 4. Infección temprana por *Salmonella Typhimurium*, en los distintos tramos de intestino delgado a 6 d.p.i. e intestino grueso. **4 A.** Ciego a 2 d.p.i. Se observa la presencia de marcaje de *S. Typhimurium* (color marrón) dentro de la mucosa. **4 B.** Colon a 2 d.p.i. **4 C.** Íleon a 6 d.p.i., donde se observa un menor marcaje de *S. Typhimurium* (color marrón) dentro de la mucosa. **4 D.** Íleon a 30 d.p.i. donde se observa una recuperación total de la mucosa del íleon con la estructura de las vellosidades y la longitud completamente recuperadas.

El progreso de la infección por *Salmonella* se evaluó en el intestino delgado y grueso a los 6, 14 y 30 d.p.i. Se apreciaron signos de recuperación inicial del epitelio, como el desarrollo de vellosidades, a los 6 d.p.i. Pese a que en este tiempo post-infección todavía podía observarse marcaje de la bacteria en la mucosa de íleon (**Figura 4 C**), hay que matizar que el íleon fue el único tramo donde se observó el marcaje de *Salmonella* a los 6 d.p.i., y reducido en comparación con los puntos de evaluación de infección temprana ( $p < 0,001$ ) (**Tabla 1**). De hecho, bajo las condiciones de infección de este estudio, no se detectó marcaje de *Salmonella* en ninguna sección intestinal en cerdos necropsiados en puntos posteriores a los 6 d.p.i. Los recuentos de células inflamatorias a 6 d.p.i. fueron significativamente más bajos que a 2 d.p.i. ( $p < 0,01$ ). Así, el recuento de neutrófilos fue similar a 1 d.p.i. ( $p = 0,163$ ) y no se observaron diferencias en el recuento de macrófagos en cerdos sacrificados a 6 d.p.i. y los cerdos del grupo control. La recuperación de las vellosidades epiteliales y la disminución del infiltrado inflamatorio fueron los principales cambios histológicos observados en las muestras de cerdos necropsiados a los 14 d.p.i., en comparación con los grupos de cerdos de los tiempos anteriores. El aspecto histológico fue similar a los 30 d.p.i. (**Figura 4 D**), con restauración completa de la estructura de la mucosa.

#### 4. LOCALIZACIÓN DE *SALMONELLA* Y CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

La presencia de *Salmonella* en el tejido linfoide fue analizada en tonsilas y NLM. Todas las muestras de cerdos del grupo control fueron negativas a *Salmonella* (**Figuras 5 A y 5 D**). Por el contrario, se detectó *Salmonella* en las tonsilas y NLM de cerdos expuestos en todos los puntos temporales de

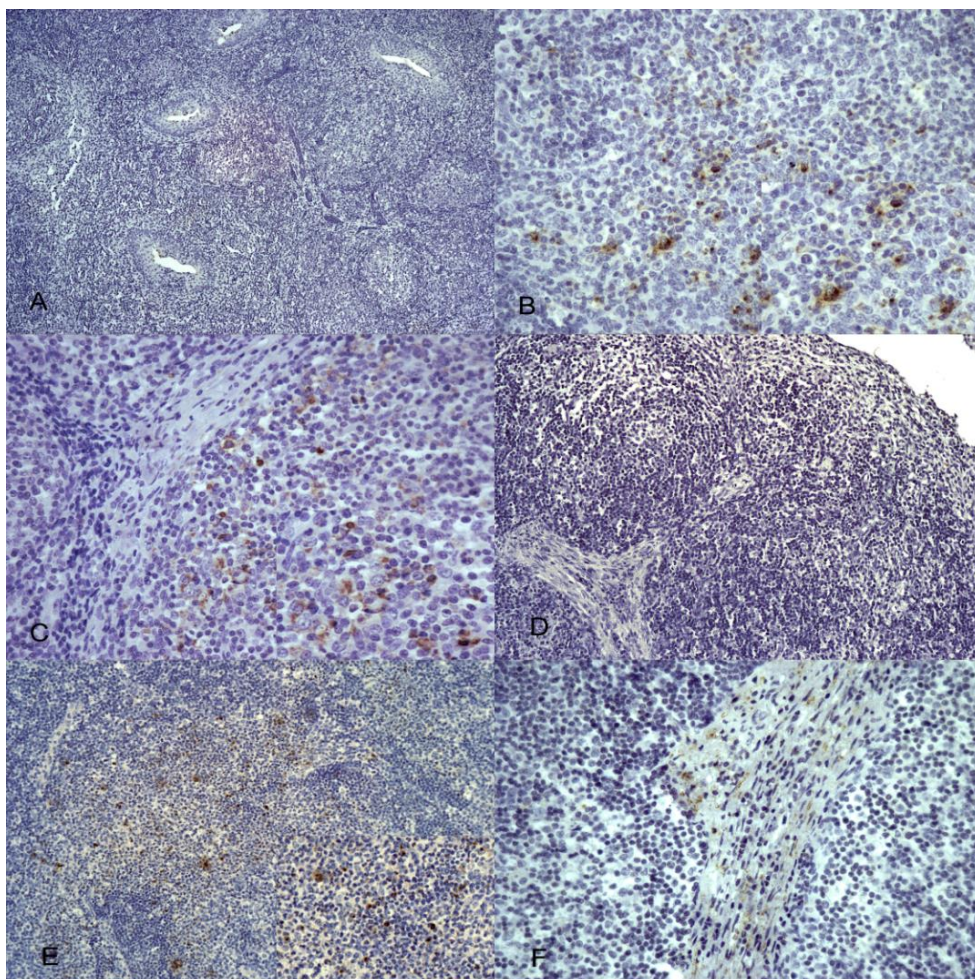


estudio. A los 2 d.p.i., *Salmonella* fue detectada en la región medular de tonsilas y NLM (**Figuras 5 B y 5 E**). El marcaje de *Salmonella* en NLM fue significativamente mayor a 2 d.p.i. ( $p < 0,001$ ) en comparación con cualquier otro momento de estudio (**Tabla 1**). También fue observada una distribución aleatoria de *Salmonella* en la médula de las tonsilas en la fase crónica de la infección (14 y 30 d.p.i.) (**Figura 5 C**). Sin embargo, en los NLMs, el marcaje de *Salmonella* se restringió al tejido conectivo de las trabéculas que separan los senos medulares (**Figura 5 F**).

La presencia de macrófagos en NLMs, así como su distribución también fue evaluada en los diferentes momentos de sacrificio, (**Tabla 3**) con diferencias significativas en el marcaje de macrófagos entre los diferentes puntos de estudio ( $p < 0,001$ ). El recuento de macrófagos en NLM a 2 d.p.i., fue significativamente mayor que en cualquier otro momento de necropsia ( $p < 0,01$ ), excepto 30 d.p.i. ( $p = 0,8$ ). De hecho, en el resto de puntos post-infección no se observaron diferencias en el recuento de macrófagos entre cerdos infectados y cerdos control a 1 d.p.i. ( $p = 0,9$ ), 6 d.p.i. ( $p = 0,8$ ) o 14 d.p.i. ( $p = 0,6$ ).

Tabla 3. Cuantificación y localización de macrófagos en NLM en cerdos infectados con *S. Typhimurium* (día 1, día 2, día 6, día 14 y día 30).

|        | NLM   |            |         |            |
|--------|-------|------------|---------|------------|
|        | Cerdo | Macrófagos | Medular | Trabéculas |
| DÍA 0  | 1     | 0,2        | +       | +          |
|        | 2     | 0,8        | +       | -          |
|        | 3     | 3,1        | +       | -          |
|        | 4     | 0,5        | +       | -          |
| DÍA 1  | 9     | 15,9       | +       | +          |
|        | 10    | 0,1        | -       | -          |
|        | 11    | 0,1        | -       | -          |
|        | 12    | 0,5        | +       | -          |
| DÍA 2  | 13    | 13,8       | +       | +          |
|        | 14    | 23,3       | +       | +          |
|        | 15    | 0,4        | +       | +          |
|        | 16    | 7,4        | +       | -          |
| DÍA 6  | 17    | 1,2        | -       | -          |
|        | 18    | 0,8        | +       | +          |
|        | 19    | 0,2        | -       | -          |
|        | 20    | 0,4        | +       | -          |
| DÍA 14 | 21    | 3,7        | +       | -          |
|        | 22    | 3,6        | +       | +          |
|        | 23    | 0,4        | +       | +          |
|        | 24    | 0,5        | +       | -          |
| DÍA 30 | 25    | 7,5        | -       | +          |
|        | 26    | 6,7        | +       | -          |
|        | 27    | 6,8        | +       | +          |
|        | 28    | 6,5        | +       | -          |



*Figura 5. Infección por Salmonella Typhimurium en tonsilas y NLM. 5 A. Control tonsila de día 0. 5 B. Tonsila a 2 d.p.i. 5 C. Tonsila a 30 d.p.i. Marcaje de S. Typhimurium (color marrón) en la zona medular de las tonsilas. 5 D. Control de NLM de día 0. 5 E. NLM a 2 d.p.i. Marcaje de S. Typhimurium en la zona medular de los NLM. 5 F. NLM a 30 d.p.i. Marcaje de S. Typhimurium en las trabéculas de los NLM.*



## Discusión

*Salmonella* es uno de los principales patógenos intestinales en el cerdo, causando no solo enfermedades en estos animales, sino que también es un riesgo para la salud pública. Estudios sobre la epidemiología y/o patogenicidad de la infección muestran que, en las circunstancias estudiadas, *Salmonella* es capaz de infectar con éxito al hospedador en unas pocas horas al mismo tiempo que se detecta al patógeno en heces en concentraciones relevantes los primeros días después de la infección (Fedorka-Cray, 1995; Lathrop et al., 2015; Lynch et al., 2017). Sin embargo, la patogénesis y la evolución de la infección en el intestino no se conoce al completo. Mediante la combinación de técnicas de inmunohistoquímica y microbiología, hemos analizado en profundidad muestras de dos desafíos con *S. Typhimurium*, para profundizar en el conocimiento de la patogénesis de la infección por *Salmonella* en el cerdo, aportando nuevos datos interesantes sobre la instauración y evolución de la infección en el cerdo.

En este estudio se describen los cambios histológicos que ocurren en la progresión de la infección en los distintos tramos intestinales en cerdos infectados con *S. Typhimurium*. Los resultados de las preparaciones de inmunohistoquímica demostraron una invasión progresiva de la bacteria a través de la mucosa del intestino delgado, junto con un daño epitelial evidente y la atrofia de las vellosidades durante las primeras 48 horas post-infección. La carga del patógeno y la infiltración de células inflamatorias alcanzaron su punto máximo a los 2 d.p.i., junto con un daño grave de la mucosa. La presencia de *Salmonella*, de células de respuesta inmune innata (neutrófilos y macrófagos) y el daño epitelial fueron particularmente evidentes en la zona del íleon. Nuestros datos están en línea con trabajos anteriores que utilizando técnicas microbiológicas (Boughton et al., 2007;

Fedorka-Cray, 1995; Hurd et al., 2002), o análisis mediante técnicas de biología molecular (Eade et al., 2016) han descrito al íleon distal como la diana de invasión de *Salmonella*. A pesar de este tropismo tisular (Monack et al., 2004), se pudo identificar *Salmonella* en la mucosa del ciego y el colon, aunque en menor cantidad. El menor marcaje observado en el intestino grueso en comparación con el íleon podría vincularse a la existencia de un ambiente anaeróbico hostil para *Salmonella* o a diferencias en los receptores de enterocitos, que pueden limitar la colonización y la invasión (Collado-Romero et al., 2010; Pickard et al., 2017; Van Parys et al., 2010).

La fase aguda de la infección, definida por signos clínicos como fiebre, diarrea y excreción de altas concentraciones de *Salmonella* en las heces, evoluciona a una fase crónica, definida por ausencia de clínica y la excreción intermitente del patógeno en las heces (Lynch et al., 2017; Wick, 2004). En el presente estudio, en el momento 6 d.p.i., que se puede definir como fase aguda tardía o fase crónica temprana, tuvieron una disminución del marcaje de *Salmonella* en el yeyuno y la mucosa del íleon, junto con evidencias de recuperación del tejido. Los recuentos de células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos) también fueron más bajos en comparación con las etapas iniciales de la infección. Este resultado, junto con la menor cantidad de bacteria observada en la mucosa, muestra el control de la infección por parte del hospedador, dentro de un marco de tiempo relativamente corto. La desaparición por completo del patógeno en la mucosa se observó a los 14 d.p.i. y la restauración de las vellosidades se detectó a los 30 d.p.i.

La concentración de *Salmonella* en el contenido de los diferentes segmentos y en las heces disminuyó conforme progresaron los tiempos de estudio, apoyando los resultados observados mediante el uso de inmunohistoquímica. De hecho, a los 14 d.p.i. y 30 d.p.i. el patógeno solo

pudo detectarse en bajas concentraciones en íleon y en muestras fecales. Estos resultados sugieren que la bacteria persiste en el tracto intestinal, incluso después de la recuperación de la pared intestinal (Boyen et al., 2006; Hurd et al., 2002; Lynch et al., 2017). La presencia de *Salmonella* en el contenido intestinal sin ningún signo de invasión de la mucosa intestinal podría estar asociada a cambios en la expresión flagelar, una posible estrategia para permanecer latente y sobrevivir dentro del intestino del hospedador tal y como se ha descrito con anterioridad (Hurd et al., 2002; Stewart et al., 2011).

La función del tejido linfoide asociado al tracto digestivo es proporcionar una defensa contra potenciales patógenos ingeridos por vía oral (Mowat, 2003; Rydstrom and Wick, 2007). Sin embargo, los órganos linfoides, como las tonsilas y los NLMs, pueden servir como refugio o reservorio de *Salmonella* dentro del hospedador (Pickard et al., 2017; Wick, 2004). Las tonsilas son los primeros órganos linfoides expuestos a patógenos ingeridos. Numerosos estudios han descrito la presencia de *Salmonella* dentro de las tonsilas después de la infección por *Salmonella* (Pickard et al., 2017; Wick, 2004), aparentemente localizadas dentro del tejido conectivo que rodea el órgano (Verbrugghe et al., 2011). Sin embargo, nuestro estudio histológico reveló la presencia del patógeno en las criptas tonsilares y en el área medular del órgano, independientemente del tiempo de estudio. Este hallazgo aporta información a cómo se distribuyen las bacterias en la estructura de las tonsilas.

A pesar de la relevancia de los NLMs en la persistencia de la infección, poco se sabe sobre cómo *Salmonella* sobrevive dentro de esta estructura. Se ha descrito que en la fase aguda de la infección, las bacterias podrían ubicarse en la región medular del órgano (Schauser et al., 2005), tal y como se observó en nuestro estudio a tiempos cortos de infección. Curiosamente, en los NLMs de cerdos sacrificados a 14 y 30 d.p.i., observamos una menor

presencia de *Salmonella* en el órgano y una redistribución de la ubicación del patógeno, restringida al área trabecular. Por lo que sabemos, este es el primer estudio que informa sobre la ubicación de las bacterias dentro de los NLMs en diferentes momentos post-infección. Estudios recientes demuestran que *Salmonella* infecta y sobrevive dentro de los fibroblastos, que son las células que forman el tejido conectivo, formando, de esta manera, un reservorio potencial para este patógeno (Garcia-del Portillo, 2001). Por otro lado, los macrófagos intestinales facilitan la supervivencia, la replicación y la propagación de *Salmonella* en todo el huésped (Haraga et al., 2008). La infección crónica es un signo de la infección activa dentro de este órgano. Tanto los macrófagos como los fibroblastos pueden estar involucrados en la persistencia del patógeno (Haraga et al., 2008; Stewart et al., 2011), que actúan como caballos de Troya donde *Salmonella* escapa a la vigilancia inmunológica y se oculta hasta que las condiciones son más favorables para volver a infectar al animal (Boyle et al., 2007; Sorrell and Caplan, 2009). Aunque los datos son interesantes, aún ofrecen muchos interrogantes por lo que es necesario realizar más estudios para dilucidar cuáles son exactamente las células diana y los posibles mecanismos por los cuales *Salmonella* puede sobrevivir dentro de los nódulos linfáticos.



# **Capítulo 2**

**Estudio transcriptómico de la mucosa de  
íleon porcino en la infección por  
*Salmonella* Typhimurium**



# Resultados

## 1. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LA MUCOSA DE ÍLEON PORCINO INFECTADA CON *SALMONELLA* TYPHIMURIUM A 2 D.P.I.

La secuenciación de muestras de ARN a través de técnicas de secuenciación masiva requiere de muestras de gran calidad y altamente purificadas. Para este estudio se seleccionaron y procesaron muestras de la infección experimental *in vivo* previamente descrita en Material y Métodos, obtenidas a partir de mucosa de íleon tras 2 días de infección con *Salmonella* Typhimurium. Dos muestras de cada tiempo de estudio (una muestra por cerdo) fueron elegidas para la extracción de ARN, en total 4 muestras de ARN (2 de 0 d.p.i. y 2 de 2 d.p.i.). Como control de calidad de la cantidad e integridad del ARN se realizaron cuantificaciones en Nanodrop 1000 (Thermo Fisher), visualización en gel de agarosa y análisis con Bioanalyzer 2100 (Agilent). Los valores de integridad del ARN (RIN) fueron todos superiores a 7, indicando su aptitud para secuenciación.

En la secuenciación se obtuvieron una media de 89.206.493 lecturas por muestra, quedando después de la limpieza y preprocesamiento una media de 74.409.728 lecturas para analizar. De esas lecturas, el 39,72 % mapeaba con el transcriptoma porcino (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de lecturas limpias de secuenciación de ARN obtenidas de las muestras de mucosa de íleon. El porcentaje fue calculado a partir del número total de lecturas limpias.

| Situación | Tiempo   | Muestra | Lecturas    | Lecturas tras filtro | % mapeadas transcriptoma porcino |
|-----------|----------|---------|-------------|----------------------|----------------------------------|
| Íleon     | 0 d.p.i. | C0A-I   | 86.396.377  | 73.126.231           | 43,06                            |
|           |          | C0B-I   | 73.834.634  | 59.090.883           | 42,85                            |
|           | 2 d.p.i. | C2B-I   | 90.316.903  | 77.319.660           | 41,06                            |
|           |          | C2C-I   | 106.278.060 | 88.102.138           | 31,91                            |

El análisis de expresión diferencial entre las muestras infectadas y las muestras control permitió detectar un total de 1.432 transcritos anotados diferencialmente expresados, pertenecientes a 1.066 genes diferentes. De ellos, 692 estaban subexpresados (64,9 %) y 374 sobreexpresados (35,1 %).

Para validar los datos de secuenciación y análisis bioinformático, se seleccionaron una serie de genes en los que se realizó qPCR comparando los niveles de expresión entre las dos técnicas (**Figura 1**). El análisis de qPCR verificó la expresión diferencial de los 5 genes seleccionados (TLR4, IL1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , FABP6 y FXR), validando así los resultados del análisis de RNA-Seq.

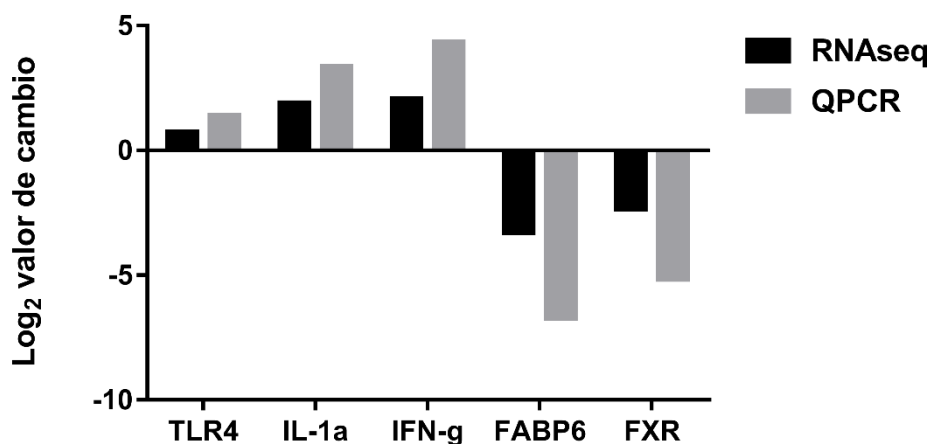


Figura 1. Validación de genes expresados diferencialmente en íleon infectado por *S. Typhimurium* a 2 d.p.i.

Dentro de los genes más sobreexpresados en este estudio se encuentran genes que codifican péptidos antimicrobianos de la familia S100 como son *S100A2*, *S100A8*, *S100A9*, y *S100A12*, así como genes de respuesta inmune  $IL1\alpha$  (*IL1A*),  $IL1\beta$  (*IL1B1*, *IL1B2*), *CXCL9*, *TNFAIP6* e *IFNG* (**Tabla 2, Archivo suplementario íleon 2 dpi**). Entre los genes con represión más marcada encontramos muchos relacionados con el metabolismo de los lípidos como son las apolipoproteínas *APOC3*, *APOA1*, *APOB*, transportadores de ácidos biliares y lípidos *FABP2* y *FABP6*, y transportadores de solutos como *SLC5A12*, *SLC2A7*, *SLC6A19*, *SLC26A3*, y *SLC5A1*.

## CAPÍTULO 2

Tabla 2. Top 50 genes sobre- y sub-expresados en íleon a 2 d.p.i. tras la infección por *S. Typhimurium*. Genes seleccionados con FDR (valor de p corregido) <0,001; Log<sub>2</sub>FC: logaritmo del valor de cambio; Rojo: sobreexpresión; verde: subexpresión.

| Genes        | Ensembl transcrito (cerdo) | log <sub>2</sub> FC |
|--------------|----------------------------|---------------------|
| ADGRE1       | ENSSSCT00000014806         | 6,44                |
| AGMO         | ENSSSCT00000016730         | -7,53               |
| AMN          | ENSSSCT00000002803         | -8,81               |
| ANXA8        | ENSSSCT00000011352         | 6,20                |
| APOA1        | ENSSSCT00000016436         | -9,17               |
| APOA4        | ENSSSCT00000016434         | -9,58               |
| APOB         | ENSSSCT00000009406         | -8,09               |
| APOC3        | ENSSSCT00000016435         | -12,91              |
| AQP8         | ENSSSCT00000027286         | -12,00              |
| ARG1         | ENSSSCT00000033548         | 6,55                |
| CPO          | ENSSSCT00000017568         | -10,18              |
| CSF3         | ENSSSCT00000019034         | 4,74                |
| CUBN         | ENSSSCT00000012072         | -8,53               |
| CXCL9        | ENSSSCT00000023437         | 4,44                |
| FABP2        | ENSSSCT00000035856         | -7,53               |
| FABP6        | ENSSSCT00000018550         | -9,76               |
| GABRP        | ENSSSCT00000026800         | 6,65                |
| GPR84        | ENSSSCT00000000312         | 4,50                |
| HPS5         | ENSSSCT00000014601         | 6,69                |
| IDO1         | ENSSSCT00000007675         | 5,39                |
| IL1B2        | ENSSSCT00000008860         | 5,49                |
| KCNJ15       | ENSSSCT00000013198         | 4,57                |
| LCN2         | ENSSSCT00000006200         | 4,56                |
| LOC100157285 | ENSSSCT00000029661         | -7,62               |
| MEP1A        | ENSSSCT00000001928         | -13,98              |
| MEP1B        | ENSSSCT00000004132         | -9,50               |
| MME          | ENSSSCT00000032959         | -7,68               |
| MTTP         | ENSSSCT00000010052         | -7,22               |
| PCK1         | ENSSSCT00000008222         | -7,02               |
| PDZK1        | ENSSSCT00000030375         | -8,42               |
| PLA2G2A      | ENSSSCT00000003882         | 12,48               |
| PLAUR        | ENSSSCT00000035015         | 4,57                |
| PROM2        | ENSSSCT00000008894         | 6,72                |
| RBP2         | ENSSSCT00000012768         | -9,37               |
| RETN         | ENSSSCT00000033014         | 4,57                |
| S100A12      | ENSSSCT00000007218         | 7,02                |
| S100A2       | ENSSSCT00000027566         | 6,23                |
| S100A8       | ENSSSCT00000036517         | 7,71                |
| S100A9       | ENSSSCT00000033945         | 6,65                |
| SDR16C5      | ENSSSCT00000006844         | -12,51              |
| SERPINB2     | ENSSSCT00000005396         | 5,27                |
| SLC11A1      | ENSSSCT00000031352         | 5,17                |
| SLC26A3      | ENSSSCT00000031097         | -7,79               |
| SLC2A7       | ENSSSCT00000003761         | -9,73               |
| SLC5A1       | ENSSSCT00000010993         | -7,67               |
| SLC5A12      | ENSSSCT00000014566         | -10,99              |
| SLC6A19      | ENSSSCT00000018638         | -7,92               |
| TACSTD2      | ENSSSCT00000004241         | 5,91                |
| TGM1         | ENSSSCT00000033123         | 5,82                |
| TNFAIP6      | ENSSSCT00000017853         | 4,92                |

Para evaluar en qué funciones biológicas o rutas de señalización estaban involucrados los genes diferencialmente expresados se realizaron análisis introduciendo el set de datos en el programa IPA, que predijo la implicación de los genes en determinadas funciones y rutas, así como activación o inhibición de dichas rutas canónicas y funciones en base a la expresión de los genes.

De forma generalizada, los resultados mostraron que la mayoría de los genes desregulados están implicados en inflamación, tráfico celular, procesos metabólicos (metabolismo de lípidos, principalmente) y de proliferación celular. Los genes implicados en respuesta inmune estaban relacionados con la activación de la respuesta inflamatoria innata, sobre todo activación y migración de células inmunes en respuesta a la infección, y activación de células presentadoras de antígenos (**Tabla 3, Archivo suplementario íleon 2 dpi**).

*Tabla 3. Funciones biológicas afectadas en la infección de S. Typhimurium en íleon. Funciones seleccionadas con valor de  $p < 0,001$ .*

| Función  |                             | Predicción | Z-score |
|--|-----------------------------|------------|---------|
| Respuesta inflamatoria (respuesta inmune de los fagocitos)   |                             | Activación | 3,8     |
| Movimiento celular, desarrollo y función del sistema hematológico, tráfico celular inmune (movimiento celular de leucocitos) |                             | Activación | 3,1     |
| Muerte celular   |                             | Activación | 3,0     |
| Eliminación de radicales libres (producción de ROS)  |                             | Activación | 2,8     |
| Señalización e interacción de célula a célula (respuesta de las células presentadoras de antígeno)                           |                             | Activación | 2,0     |
| Transporte molecular   |                             | Inhibición | -2,6    |
| Metabolismo de los lípidos, transporte molecular, bioquímica de moléculas pequeñas   | Concentración de colesterol | Inhibición | -2,1    |
|  | Transporte de colesterol    | Inhibición | -2,4    |
|  | Flujo de salida de lípidos  | Inhibición | -2,2    |
|  | Captación de lípidos        | Inhibición | -2,3    |

Las funciones biológicas alteradas (**Tabla 4, Archivo suplementario íleon 2 dpi**) se encuadraron en dos vertientes fundamentales: en primer lugar, aquellas que se predijo que estaban activadas (z-score positivo) y las que se predijeron como inhibidas (z-score negativo) basadas en la expresión de los genes que las constituyen. Entre las primeras (activadas) encontramos rutas relacionadas con la respuesta inflamatoria mediadas por NF- $\kappa$ B, producción de citoquinas (IL1, IL6, IL8), potenciadores de la respuesta inmune como HMGB1, activación de inflamasoma y migración celular, apoptosis y señalización de p53 y p38, entre otras. También encontramos indicios de actividad autofágica ligada a la señalización de p53 y la ruta de apoptosis, destacando la sobreexpresión de genes como el DRAM1, definido como un modulador de la actividad lisosomal de la autofagia que juega un papel central en la apoptosis mediada por p53. Como consecuencia de la respuesta inflamatoria también vimos alteración en la expresión de genes involucrados en la síntesis de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Óxido Nítrico (NO), quimiotaxis celular, infiltración, muerte celular (necrosis y apoptosis), reclutamiento y proliferación celular, entre otras.

En el lado opuesto, entre las rutas inhibidas (z-score negativo), se encontraban las mediadas por receptores nucleares (PPAR/RXR, LXR/RXR) involucradas en el metabolismo de lípidos, y la ruta del interferón.



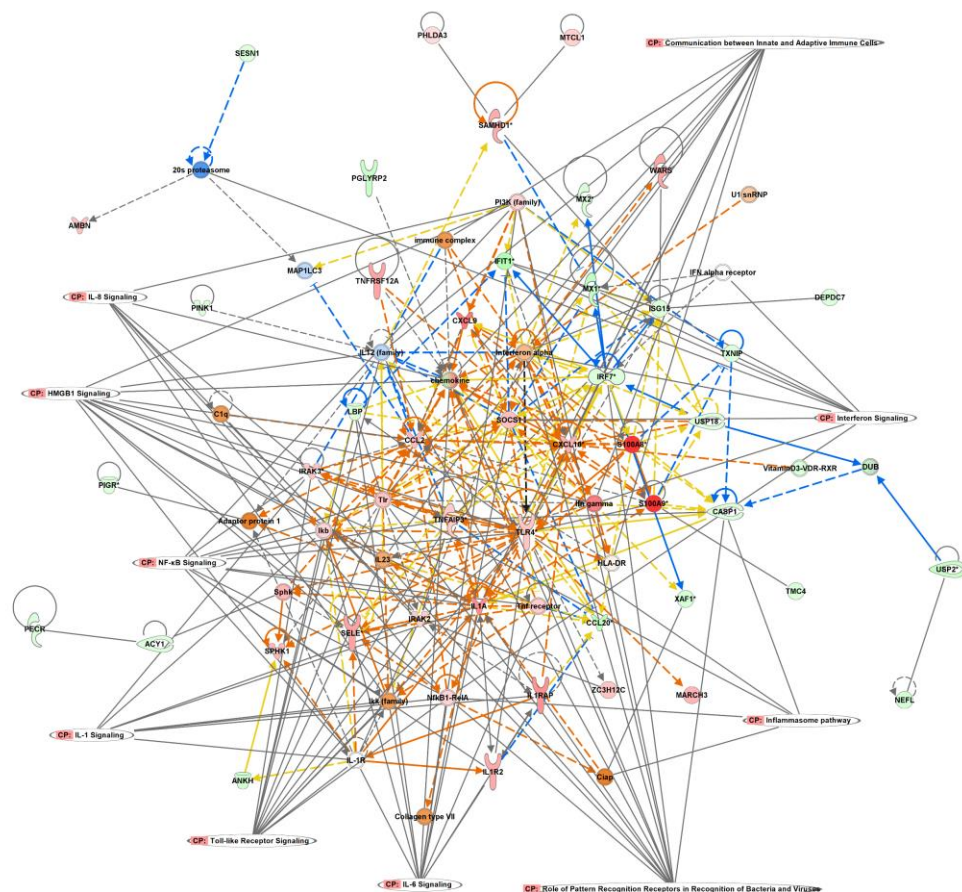
Tabla 4. Principales rutas de señalización afectadas por los genes diferencialmente expresados en mucosa de íleon infectado por *Salmonella Typhimurium* a 2 d.p.i. mediante el software IPA. Rutas seleccionadas con valor de  $p < 0,05$ .

| Rutas de señalización                              | Z-score | Genes   |
|--|---------|---|
| Activación LXR/RXR                                 | -3,13   | ABCA1,ABCG8,APOA1,APOA4,APOC3,ARG2,CCL2,CD14,CD36,IL1A,IL1R2,IL1RAP,LBP,MLXIPL,NOS2,NR1H4,PTGS2,RBP4,RELA,RXRG,S100A8,SAA1,TLR4TNF,TNFRSF1B   |
| Inhibición mediada por LPS / IL1 de la función RXR | 1,60    | ABCA1,ABCB1,ABCC2,ABCG8,ACSL1,ACSL3,ALDH18A1,ALDH1B1,ALDH6A1,ALDH9A1,CD14,CHST3,CHST4,FABP1,FABP2,FABP6,FMO5,GSTK1,GSTM4,IL1A,IL1R2,IL1RAP,LBP,MAOA,MAOB,NR1H4,NR1I2,PPARGC1A,SLC27A2,SULT1B1,TLR4,TNF,TNFRSF1B |
| Señalización Interferón                            | -1,51   | IFIT1,IFIT3,IFITM1,IFNG,IRF1,ISG15,JAK2,MX1,OAS1,RELA,SOCS1   |
| Señalización IL6                                   | 2,50    | ABCB1,AKT3,CD14,CEBPB,CXCL8,IL1A,IL1R2,IL1RAP,JAK2,LBP,NFKBIA,PIK3R5,RELA,SOCS1,SOC3,TNF,TNFAIP6,TNFRSF1B   |
| Regulación del MIF de la inmunidad innata          | 2,33    | CD14,NFKBIA,NOS2,PLA2G12B,PLA2G2A,PLA2G2D,PTGS2,RELA,TLR4   |
| Señalización HMGB1                                 | 3,21    | AKT3,CCL2,CXCL8,ICAM1,IFNG,IL1A,OSM,PIK3R5,RELA,RHOB,RHOU,SELE,TLR4,TNF,TNFRSF1B  |
| Señalización NF- $\kappa$ B                        | 1,21    | AKT3,CD40,GHR,IL1A,IL1R2,IRAK3,MAP3K8,NFKBIA,PIK3R5,RELA,TDP2,TLR4,TNF,TNFAIP3,TNFRSF11A,TNFRSF1B,TNFSF11,TNFSF13B  |
| Señalización de receptores tipo Toll (TLR)         | 1,89    | CD14,IL1A,IRAK2,IRAK3,LBP,NFKBIA,RELA,TLR4,TNF,TNFAIP3  |
| Señalización IL8                                   | 2,67    | AKT3,CXCL8,CYBB,GPLD1,HBEGF,HMOX1,ICAM1,IRAK2,IRAK3,NCF2,PIK3R5,PLD1,PRKCE,PTGS2,RELA,RHOB,RHOU   |
| Señalización IL1                                   | 2,53    | ADCY4,GNA11,GNA14,GNA15,IL1A,IL1RAP,IRAK2,IRAK3,NFKBIA,RELA   |
| Activación PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$             | -1,60   | ABCA1,ADCY4,APOA1,CD36,GHR,GNA11,GNA14,GNA15,IL1R2,IL1RAP,JAK2,NFKBIA,PLCD3,PPARGC1A,RELA   |
| Ruta del inflamasoma                               | 1,00    | CASP1,CXCL8,NLRP3,TLR4  |
| Señalización p38 MAPK                              | 2,53    | IL1A,IL1R2,IL1RAP,IRAK2,IRAK3,PLA2G12B,PLA2G2A,PLA2G2D,TNF,TNFRSF1B   |
| Señalización JAK/Stat                              | 1,13    | AKT3,CEBPB,JAK2,PIK3R5,RELA,SOCS1,SOCS3   |
| Señalización de MAPK estimulada por LPS            | 1,63    | CD14,LBP,NFKBIA,PIK3R5,PRKCE,RELA,TLR4  |

## 2. RESPUESTA INFLAMATORIA EN MUCOSA DE ÍLEON PORCINO EN LA INFECCIÓN POR *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

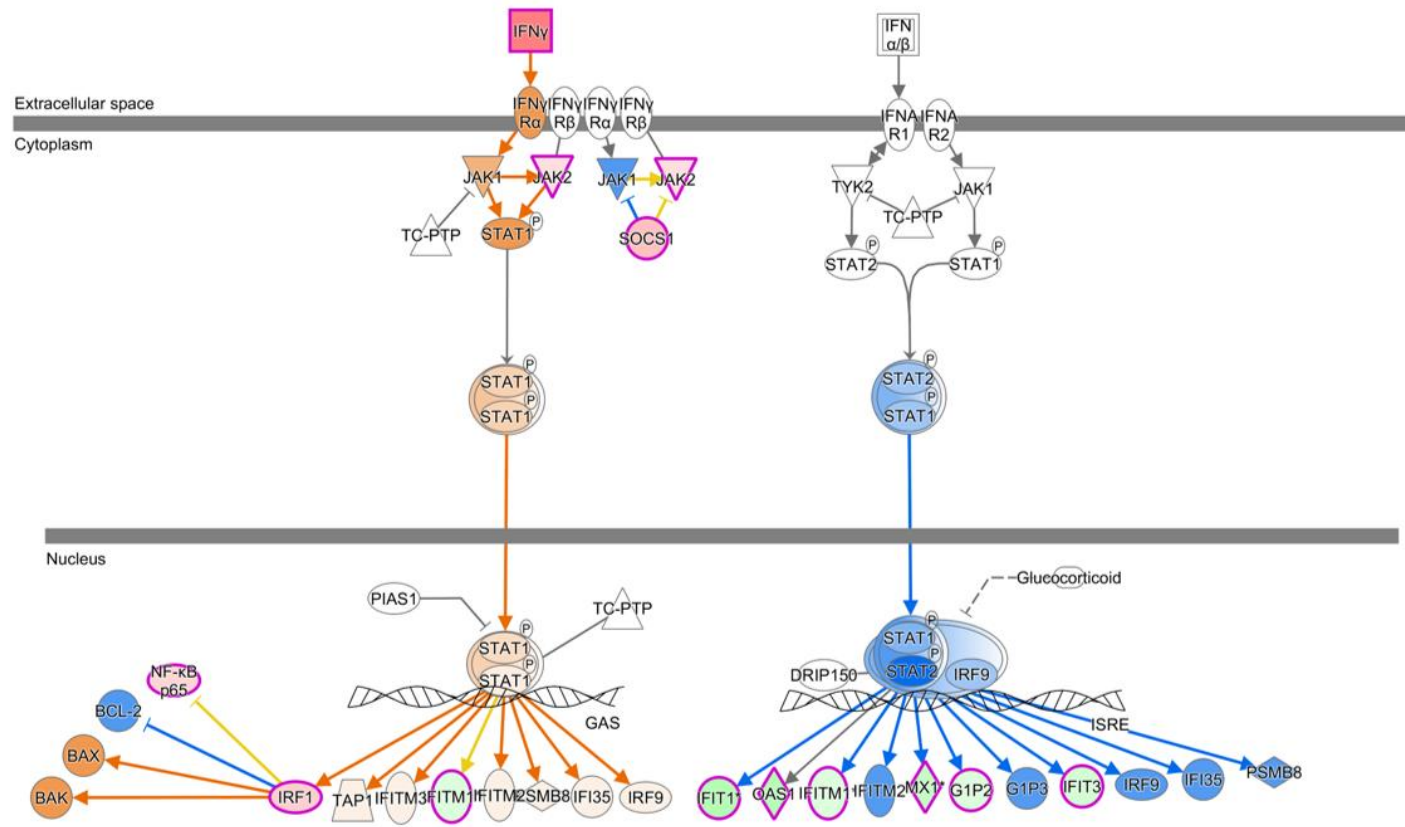
Las rutas relacionadas con el estado inflamatorio están conectadas entre sí por determinados genes que son comunes a varias vías de señalización. En la **Figura 2** se pone de manifiesto la conexión entre las rutas de síntesis de citoquinas, señalización mediada por receptores TLR, reconocimiento de patrones de bacterias y virus, potenciadores de la respuesta inmune como HMGB1 y la ruta del inflammasoma (la cual se encuentra activada debido a la conexión TLR dependiente, ya que el punto activo de la caspasa 1 se encuentra inhibido). Además, es importante destacar la expresión de transcritos que codifican proteínas de carácter antimicrobiano como las de la familia S100 (*S100A8* y *S100A9*). El análisis de estos datos reveló que las principales moléculas involucradas en la activación de la mayoría de las rutas inflamatorias son la *IL1* y *TNF*.

Todo este conjunto de citoquinas y quimiocinas permite la activación de la comunicación entre la respuesta inmune innata y adaptativa. La única excepción es la predicción de inhibición de parte de la ruta de interferón (**Figura 3**) durante la infección con *S. Typhimurium*. Dicha inhibición se observó en las rutas de IFN- $\alpha$  y IFN- $\beta$ , ya que la actividad mediada por IFN- $\gamma$  se mantuvo activada por la sobreexpresión de *IFNG*. Esta predicción está basada en la subexpresión de *IFIT1*, *OAS1*, *IFITM1*, *MX1*, *G1P2*, e *IFIT3*.



© 2009-2020 QIAGEN. All rights reserved.

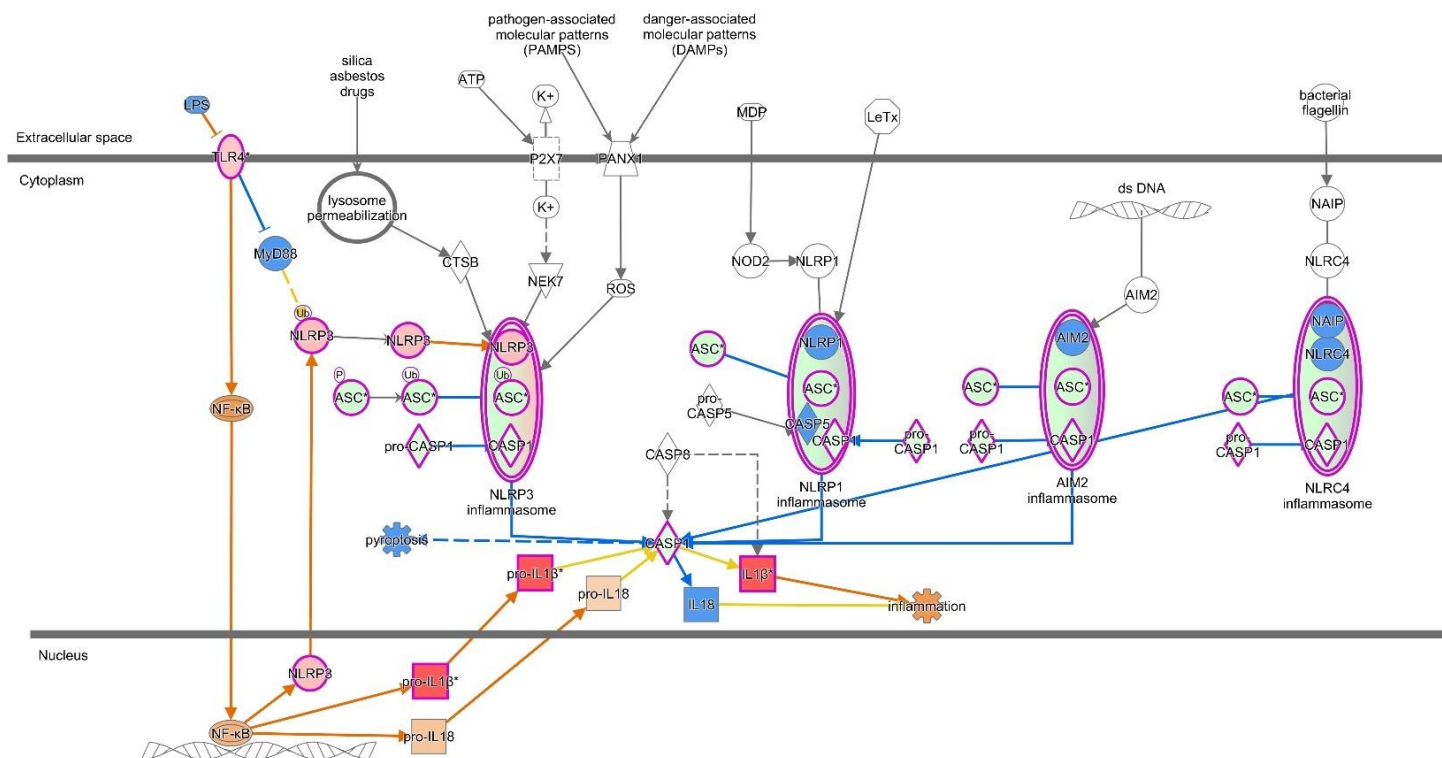
Figura 2. Red de interacción generada a partir de la integración de rutas canónicas relacionadas con activación de la inflamación. Verde: subexpresión; rojo: sobreexpresión; líneas naranjas: predicción de activación; líneas azules: predicción de inhibición.



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 3. Ruta de señalización del interferón, obtenida mediante la herramienta de predicción de IPA. Verde: subexpresión; rojo: sobreexpresión; naranja: predicción de activación; azul: predicción de inhibición.

La inflamación puede activarse a través de señales intracelulares como la ruta de activación del inflamasoma, de la cual tenemos presentes varios genes como *CASP1*, *CXCL8*, *NLRP3*, *NLRP6* y *TLR4* (**Tabla 4**), de los cuales están todos sobreexpresados excepto *CASP1* y *NLRP6*, que están subexpresados. Los inflamasomas son complejos multiproteicos que activan la cascada inflamatoria. Se forman por la unión de distintas proteínas cuya finalidad es la maduración de las caspasas que a su vez activarán la cascada inflamatoria mediada por IL1 $\beta$ , IL18 e interferón gamma (IFN $\gamma$ ). En nuestro estudio, concretamente vimos alterada la actividad del inflamasoma *NLRP3* (**Figura 4**). Sería lógico pensar que, al tener unas evidencias tan claras de la fuerte inflamación que ocurre en la mucosa, el inflamasoma *NLRP3* estaría también activado. La única parte del complejo activada es la sobreexpresión del gen *NLRP3* que es el encargado de reconocer patrones moleculares del patógeno. El resto de los componentes del complejo, como la proteína de ensamblaje TXNIP están subexpresados. Además, la caspasa 1 se encuentra también subexpresada, lo que sugiere que no se está estimulando su maduración a través de este complejo.

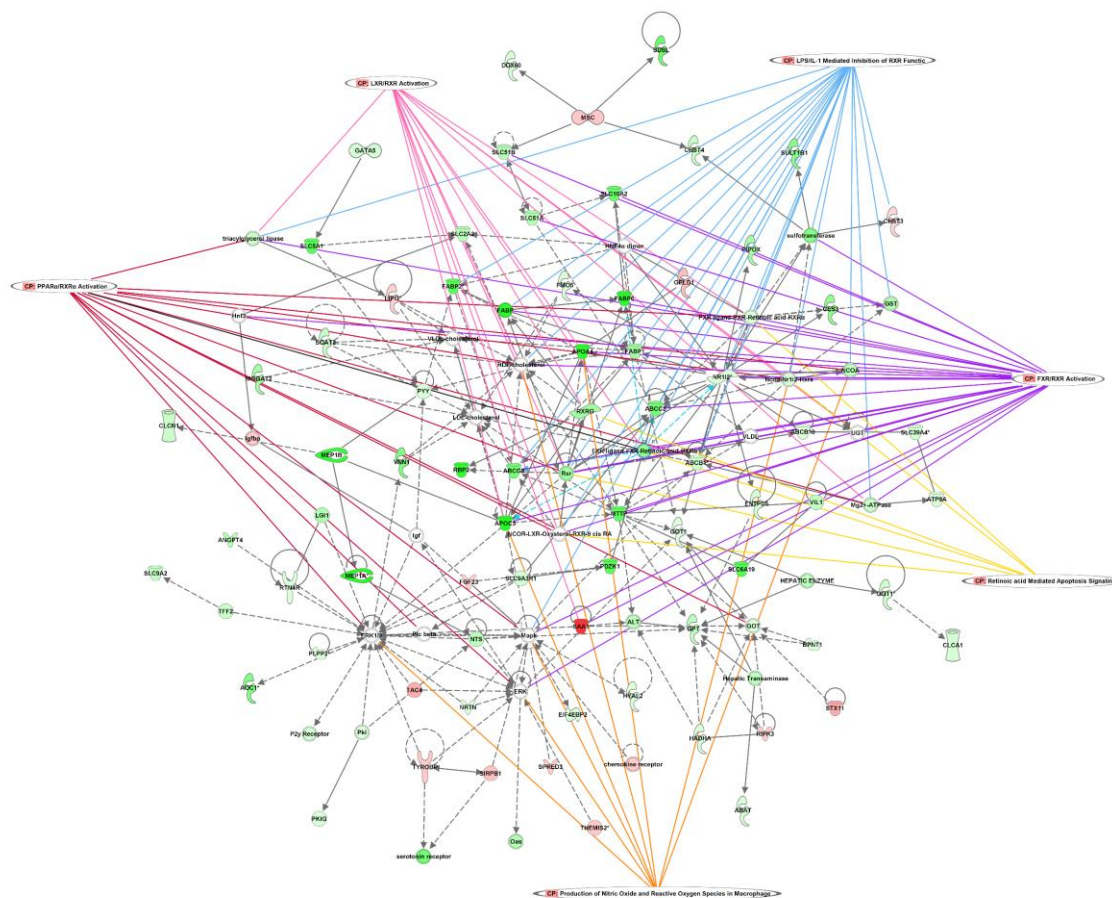


© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 4. Ruta del inflammasoma, obtenida mediante la herramienta de predicción de IPA. Rojo: sobreexpresión; Verde: subexpresión; Naranja: Activación; Azul: Inhibición.

### 3. ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS EN MUCOSA DE ÍLEON EN LA INFECCIÓN POR *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Como hemos mencionado previamente, también existe una regulación negativa de otras rutas como la del metabolismo de ácidos biliares. Las rutas afectadas son las mediadas por la actividad del receptor de retinoide X (RXR), así como la activación conjunta de PPAR/RXR, FXR/RXR y LXR/RXR, la mediada por LPS / IL1, y la señalización de la apoptosis mediada por ácido retinoico (**Tablas 3 y 4, Figura 5**). En los análisis de predicción observamos que la activación de la cascada de inflamación mediada por IL1 inhibe el receptor nuclear retinoide RXR, que está involucrado en transporte de lípidos y sales biliares cuando forma dímero con LXR o FXR, respectivamente. En nuestro estudio observamos la subexpresión de FXR (*NR1H4*) y genes regulados por éste, la mayoría de los cuales participan en el ciclo de reciclaje de las sales biliares, es decir, en la captación y absorción, a nivel intestinal, de la bilis a través de la mucosa de íleon. En condiciones fisiológicas, las sales biliares son transportadas de nuevo a hígado para ser recicladas y así no tener que sintetizarlas continuamente. Una vez en hígado, la bilis se acumula en la vesícula biliar para ser liberada otra vez en el tracto gastrointestinal (duodeno) durante la digestión.

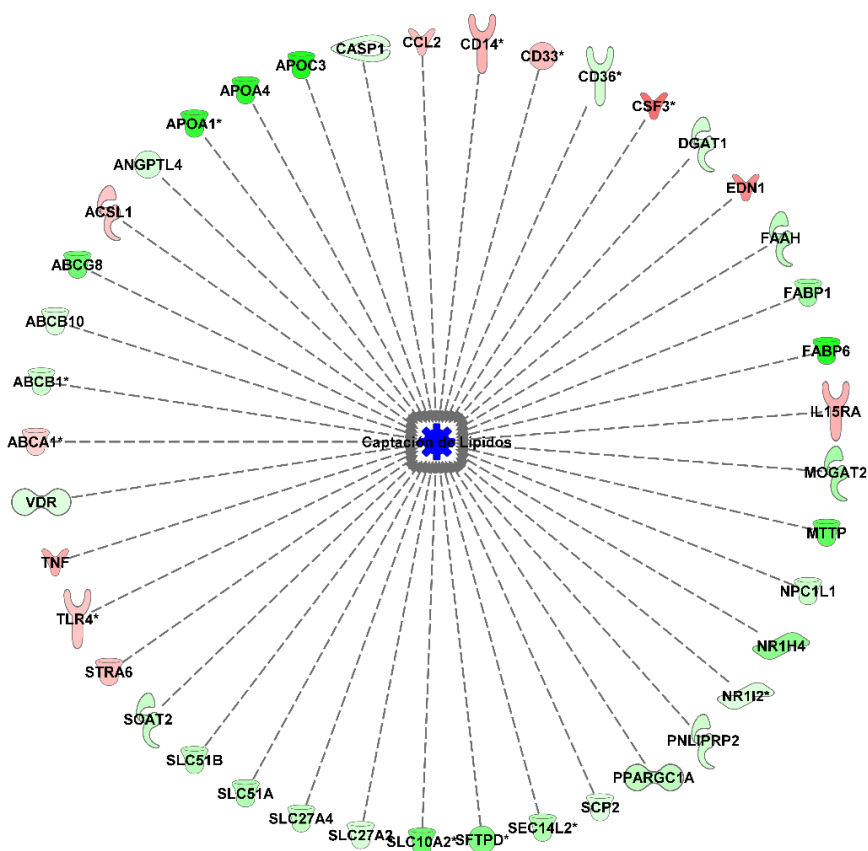


© 2000-2020 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 5. Red de interacción generada a partir de la integración de rutas canónicas relacionadas con el metabolismo de lípidos. Se observa una regulación negativa de la mayoría de genes implicados. Verde: subexpresión. Rojo: sobreexpresión



De entre los genes encargados de la captación de lípidos encontramos, además de los genes reprimidos previamente descritos, genes de respuesta inflamatoria que podrían estar ligando ambas funciones biológicas que se ven más alteradas en la infección con *S. Typhimurium* (metabolismo de lípidos e inflamación) como son *TLR4*, *TNF*, *CCL2*, y *IL15RA* (**Figura 6**).



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 6. Red de interacción generada a partir de los genes directamente relacionados con el metabolismo de los lípidos. Se incluyen algunos genes de respuesta inflamatoria. Verde: subexpresión. Rojo: sobreexpresión.

El metabolismo biliar está finamente regulado para un óptimo aprovechamiento de la bilis, y también para evitar el daño celular que podría causar la alta concentración de sales biliares en la mucosa del intestino. El regulador principal de este eje es el receptor nuclear FXR, subexpresado en la infección por *Salmonella* a nivel de la mucosa de íleon (**Figura 7**). Examinando la ruta a todos sus niveles, nuestros resultados parecen indicar que la regulación negativa del ciclo de las sales biliares está mediada por la regulación negativa de los genes reguladores FXR y RXR. En ella podemos observar que procesos como la lipogénesis, el metabolismo y el flujo del colesterol están inhibidos. Los genes implicados en estos procesos son moléculas de síntesis (*ACSL1*, *DGAT1*), unión a sales biliares y colesterol (*FABP1* y *FABP6*), receptores (*NR1H4* (FXR), *NR1I2* (PXR) Y *VDR*) y transportadores de la familia ABC (*ABCA1*, *ABCB1*, *ABCB10*, *ABCG8*), familia APO (*APOA1*, *APOA4*, *APOC3*), familia NPC (*NPC1L1*) y familia SLC (*SLC10A2*, *SLC27A2*, *SLC51A*, *SLC51B*). Menos los genes *ABCA1* y *ACSL1*, implicados en el transporte bidireccional y síntesis de lípidos, respectivamente, el resto están todos subexpresados.

Nuestros resultados evidenciaron que la respuesta mediada por IL1 y TNF provoca un bloqueo en la absorción de sales biliares a nivel de epitelio intestinal mediado por FXR (**Figura 7**), demostrado por una represión del receptor nuclear FXR (*NR1H4*) que a su vez regula genes de la familia SLC (*solute carriers*, transportadores de solutos), como *SLC10A2* (ASBT, principal transportador de entrada apical de sales biliares), los transportadores intracelulares de sales biliares *FABP1* y *FABP6*, transportadores de la familia ABC como *ABCB1*, *ABCB10* y *ABCG8* (transportadores lipídicos de membrana), *PNLIPRP2* (enzima lipasa implicada en la metabolización de lípidos), *PPARGC1A* (activador transcripcional de receptores de lípidos), y transportadores OSTa y OSTb (*SLC51A* y *SLC51B*), que exportan sales biliares al torrente sanguíneo.

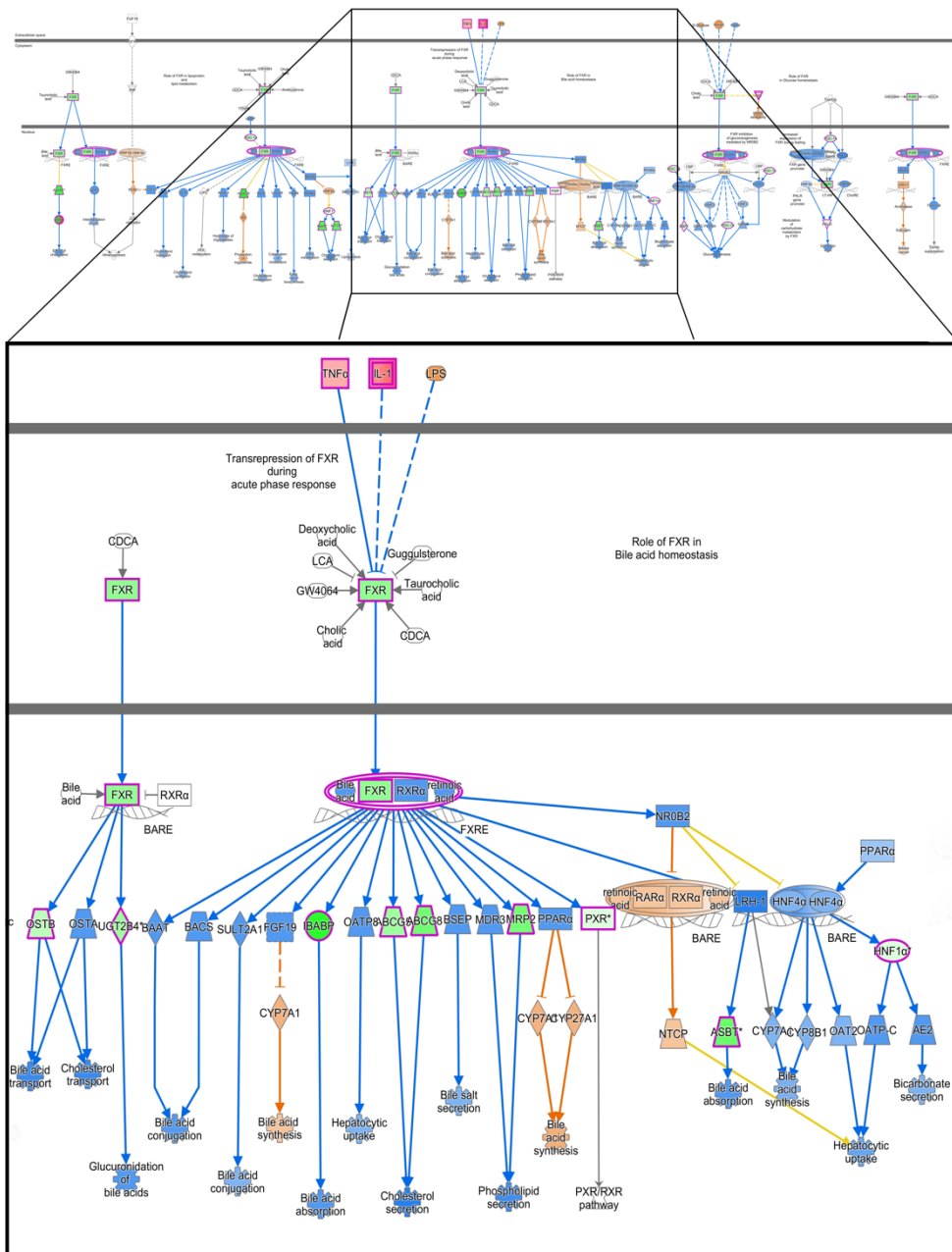


Figura 7. Ruta de señalización de FXR/RXR. Rojo: sobreexpresión; Verde: subexpresión; Naranja: activación; Azul: inhibición.

#### 4. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VESÍCULA BILIAR E HÍGADO EN LA INFECCIÓN POR *SALMONELLA* EN EL CERDO

Para evaluar el alcance de la desregulación del metabolismo de las sales biliares, procedimos a analizar la vesícula biliar y el hígado de los animales infectados, para luego evaluar los genes implicados mediante un estudio dirigido de expresión génica por PCR cuantitativa.

##### ***I. Estudio histológico y detección de Salmonella en la vesícula***

El estudio histológico mostró una morfología normal, sin daños en el epitelio de la vesícula biliar. Se procedió a evaluar la presencia de *Salmonella* en la vesícula biliar de los animales infectados a 2 d.p.i. Se analizó la vesícula biliar de los 4 cerdos control y los 4 cerdos a 2 d.p.i., por inmunohistoquímica y qPCR con sonda TaqMan. No se detectó *Salmonella* en ninguna de las muestras procesadas, ni por inmunohistoquímica (**Figura 8**) ni por qPCR.

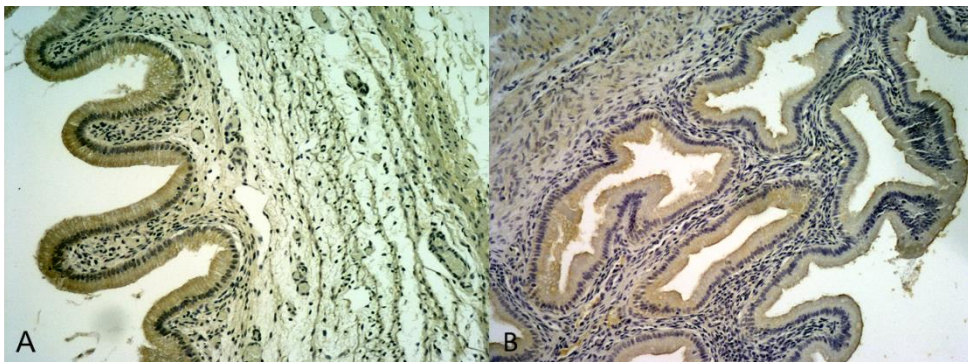


Figura 8. Inmunohistoquímica de *Salmonella Typhimurium* en vesícula biliar. A) Vesícula control. B) Vesícula a 2 d.p.i.

Las muestras de hígado también fueron analizadas mediante inmunohistoquímica, pero tal y como muestran las imágenes de la **Figura 9**, tampoco se detectó bacteria en este tejido.

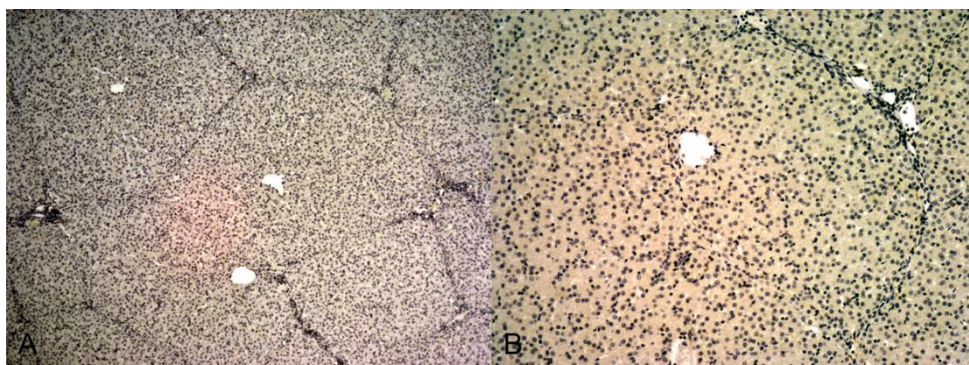


Figura 9. Inmunohistoquímica de *Salmonella Typhimurium* en hígado. A) Hígado control. B) Hígado a 2 d.p.i.

## ***II. Estudio de expresión de genes asociados a la respuesta inmune y producción de sales biliares.***

Se realizó un estudio de expresión génica dirigido a genes de respuesta inflamatoria y del metabolismo biliar en vesícula e hígado. En vesícula biliar, los resultados mostraron ausencia de expresión de la mayoría de las citoquinas valoradas (*IL1B*, *IL1A*, *IL8*) mostrando, por tanto, un estado no inflamatorio del tejido.

En el estudio de expresión génica en hígado se emplearon muestras de hígado de cerdos control (día 0) y cerdos infectados 2 d.p.i. Los resultados obtenidos mostraron la alteración provocada por la infección donde se observó que los genes relacionados con el metabolismo biliar estaban subexpresados (*APOA1*, *FGFR4* y *SLC51B*), mientras que algunos genes relacionados con la respuesta inflamatoria (*TNF- $\alpha$* ) y reconocimiento de la bacteria (*TLR2*) estaban sobreexpresados (**Figura 10**).

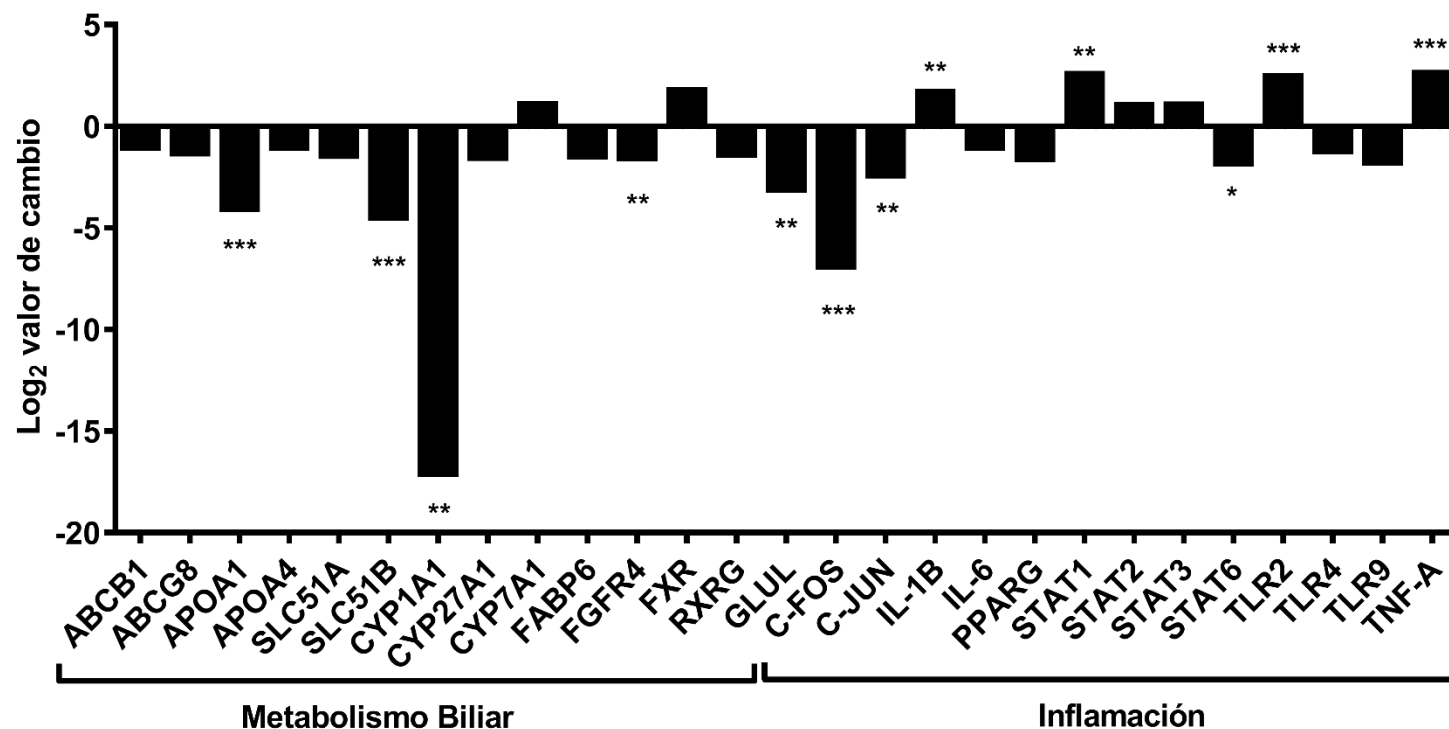


Figura 10. Estudio de expresión de genes relacionados con el metabolismo biliar. Se realizó en muestras de hígado infectadas con *Salmonella Typhimurium* a 2 d.p.i. Valor de  $p < 0,05$  (\*), Valor de  $p < 0,01$  (\*\*), Valor de  $p < 0,001$  (\*\*\*)

## 5. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM DURANTE LA INFECCIÓN EN ÍLEON A 2 D.P.I.

Inicialmente, la secuenciación y el análisis de estas muestras fue enfocado desde un punto de vista dual, donde se pretendió obtener información del transcriptoma tanto de las células del tracto digestivo junto con información del transcriptoma de la bacteria *Salmonella* Typhimurium. Para ello, se utilizó un kit de creación de librerías que permitía la amplificación de transcritos eucariotas y procariotas (ver sección Material y Métodos). Los resultados de secuenciación a la profundidad empleada no permitieron la obtención de un número relevante de lecturas del patógeno, mostrando que en esas condiciones no es posible estudiar el patógeno en muestras *in vivo*. Sin embargo, aunque el número de lecturas fue muy limitado, obtuvimos expresión de genes de la bacteria (**Tabla 5**). Entre ellos observamos presencia de lecturas procedentes de genes de virulencia incluidos en la SPI-2 de *Salmonella*, como son *pipB2*, *sseJ* y *sseB* los cuales intervienen como efectores en el proceso de infección (**Figura 11**), genes que hacen frente a la respuesta antimicrobiana como *virK* y *Mig-14*, y genes encargados de la translocación de distintos efectores, como *sscA*, para hacer frente a la respuesta inmune hospedadora.

Tabla 5. Expresión de genes de *Salmonella Typhimurium* en ileon porcino a 2 d.p.i. Se muestra el número medio de lecturas en muestras control e infectadas, habiendo seleccionado los genes con al menos 1 lectura en animales infectados y seleccionando los que tienen más lecturas en infectados que en controles. Azul: factores de virulencia (PATRIC).

| Genes         | Media lecturas C0 | Media lecturas C2 | Función   |
|---------------|-------------------|-------------------|---|
| <i>clpB</i>   | 0                 | 5,5               | Proteína Chaperona ClpB; Parte de un sistema de múltiples chaperonas inducido por el estrés, está involucrado en la recuperación de la célula del daño inducido por el calor, en cooperación con DnaK, DnaJ y GrpE; Pertenece a la familia ClpA / ClpB. |
| <i>PipB2</i>  | 0                 | 3                 | Efactor del sistema de secreción tipo III de SPI-2.   |
| <i>ompX</i>   | 0                 | 2,5               | Proteasa de membrana externa ompX; involucrado en la adhesión celular.  |
| <i>virK</i>   | 0                 | 2,5               | virK es importante durante la infección por <i>Salmonella</i> en la resistencia frente a péptidos catiónicos  |
| <i>clpA</i>   | 0                 | 2                 | Serina proteasa dependiente de ATP ClpA-ClpP; dirige la proteasa a sustratos específicos.   |
| <i>gpmA</i>   | 0                 | 1,5               | 2,3-bisfosfoglicerato dependiente de fosfoglicerato mutasa; Cataliza la interconversión de 2-fosfoglicerato y 3-fosfoglicerato; Pertenece a la familia de las fosfoglicerato mutasa.  |
| <i>gcpE</i>   | 0                 | 1,5               | 4-hidroxi-3-metilbut-2-en-1-il difosfato sintasa. Convierte el 2,4-ciclodifosfato de 2C-metil-D-eritritol (ME-2,4cPP) en 1-hidroxi-2-metil-2- (E) -butenil 4-difosfato.   |
| <i>sseJ</i>   | 0                 | 1,5               | Efactor del sistema de secreción tipo III SPI-2. Implicado en la supervivencia bacteriana en la célula huésped.   |
| <i>galU</i>   | 0                 | 1,5               | Junto con la subunidad GalF compone la UTP: glucosa-1-fosfato uridililtransferasa, una enzima que cataliza la formación de UDP-glucosa a partir de UTP y alfa-D-glucosa 1-fosfato; regula los niveles celulares de UDP-glucosa.                         |
| <i>mig-14</i> | 0                 | 1,5               | Proteína de resistencia a los antimicrobianos   |
| <i>sseB</i>   | 0                 | 1                 | Efactor del sistema de secreción tipo III SPI-2. Necesario para la correcta localización de SseC y SseD en la superficie celular bacteriana.  |
| <i>sscA</i>   | 0                 | 1                 | Chaperona del sistema de secreción tipo III de CesD / SycD / LcrH; Está involucrado en la translocación de proteínas efectoras en la célula huésped   |





Figura 11. Ruta KEGG del proceso de infección por *Salmonella*. Verde: principales genes de *Salmonella* implicados en el proceso de infección. Rojo: genes de *Salmonella* encontrados en muestras de íleon infectadas por *Salmonella* a 2 d.p.i.



## Discusión

En el estudio de la patogénesis de procesos infecciosos, la técnica dual RNA-Seq permite el estudio en profundidad del transcriptoma del patógeno y hospedador, revelando datos de interés que nos ayudan a comprender qué mecanismos utiliza el primero para colonizar e invadir, y cómo la respuesta inmunitaria del hospedador reacciona frente al patógeno. Gracias a esta técnica se ha aumentado exponencialmente nuestro conocimiento sobre diferentes organismos, tanto eucariotas como procariotas (Garcia-Del Portillo and Pucciarelli, 2017). En este estudio hemos analizado el perfil transcriptómico de la mucosa intestinal porcina, en conjunto con el perfil transcriptómico de *Salmonella* Typhimurium, mediante dual RNA-Seq.

Nuestros resultados indican la existencia de un potente estado inflamatorio causado por la activación de receptores TLR tras el reconocimiento de la bacteria. Estos receptores desencadenan una cascada de señalización mediada por el factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) que termina con la activación de la respuesta inmune innata. En el punto inicial de la infección, estos receptores se activan mediante el reconocimiento de regiones conservadas comunes entre múltiples patógenos (Medzhitov, 2007). Concretamente van dirigidos hacia una amplia gama de ligandos como el lipopolisacárido (TLR4), lipoproteínas (TLR2), flagelina (TLR5), islas CPG no metiladas (TLR9), moléculas de ARN bicatenario (TLR3) y ARN monocatenario (TLR7 y TLR8) (Kawai and Akira, 2005). La expresión de este conjunto de receptores se vincula con la inducción de mecanismos antimicrobianos como las proteínas de la familia S100 (S100A2, A8, A9 y A12), familia EDN (EDN1 y EDN3) y LTF; reclutamiento de fagocitos mediado por citoquinas y quimiocinas (familias CCL y CXC); y producción de ROS en el foco de la infección (Meyerholz et al., 2002). Además, la activación de receptores TLR

promueve la actividad de la respuesta inmune adaptativa a través de la estimulación de distintos tipos celulares, como por ejemplo las células dendríticas (Iwasaki and Medzhitov, 2004).

La detección, contención y reparación del daño causado en las células del epitelio intestinal durante la infección requiere señales de advertencia en las células que respondan a ellas a través de receptores y vías de señalización. Una parte de este sistema ha sido reconocido y estudiado intensamente durante los últimos años: los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Bianchi, 2007). Son descritos como un conjunto diverso de moléculas microbianas que comparten una serie de características bioquímicas diferentes reconocibles que alertan al organismo de patógenos intrusos. Dichos PAMPs pueden ser de carácter extracelular o intracelular. Los extracelulares son reconocidos por las células del sistema inmune innato y adquirido, principalmente a través de TLRs, que activan varias vías de señalización, entre las cuales NF- $\kappa$ B es la más común (Bianchi, 2007). En nuestro set de datos solo aparece sobreexpresado el gen TLR4, cuyo ligando directo, de carácter bacteriano, es el LPS bacteriano. Este hecho parece actuar en primer lugar desencadenando la respuesta inmune innata a través de una cascada de señalización que comienza en la superficie celular. En nuestros datos vemos representada esta cascada de señales con la participación de distintas moléculas entre las que se encuentran las relacionadas con la ruta de señalización NF- $\kappa$ B como *RELA*, *PIK3R5*, *IRAK3*, *GHR*, *CD14*, *CD40*, *NFKBIA*, *TDP2*, *AKT3* Y *MAP3K8*. La acción conjunta de todas estas moléculas termina en la activación de mediadores de la respuesta inmune innata generando un estado inflamatorio del tejido (De Nardo, 2015).

Pero ésta no es la única vía de activación de la respuesta inmune innata. Otros autores han descrito que existen rutas de activación que comienzan por cascadas de señalización en el interior celular y no en la superficie, tal

y como indica la explicada anteriormente por TLR4 (Hagar et al., 2013; Shi et al., 2014). Para la detección de PAMPs intracelulares se han descrito la existencia de unos complejos proteicos denominados inflamomas (Vanaja et al., 2015). Dichos complejos se definen como plataformas multiproteicas ensambladas, principalmente, en respuesta frente a patógenos intracelulares. Por lo general, estos complejos están formados por una proteína sensora, una proteína adaptadora y un zimógeno (procaspasa-1). Tras una señal de activación (PAMP intracelular), la formación del ensamblaje del inflamoma da como resultado el procesamiento de la procaspasa-1 inactiva en una enzima cisteína-proteasa activa, denominada caspasa-1, que posteriormente activa las citoquinas proinflamatorias, IL1 $\beta$  e IL18, induciendo piroptosis, una forma inflamatoria altamente pirogénica de muerte celular (Vanaja et al., 2015). Se han descrito numerosas moléculas intracelulares encargadas de reconocer PAMPs, siendo los NLRs una de las familias más comúnmente estudiadas. Uno de los que están mejor descritos es NLRP3, el cual necesita inicialmente la estimulación de NF- $\kappa$ B para activarse (Bauernfeind et al., 2009). Por ejemplo, la unión de LPS a TLR4 activa la cascada de señalización mediada por NF- $\kappa$ B induciendo la expresión de NLRP3 (así como de IL1 $\beta$ ), e induciendo la desubiquitinación de la proteína NLRP3 inactiva. El siguiente paso consiste en la activación de la proteína adaptadora ASC, mediante procesos de ubiquitinación y fosforilación, provocando la activación canónica del complejo (Bauernfeind et al., 2009). Una vez activado, su misión es detectar el estrés celular, causado por agentes patógenos o desregulación metabólica, dando como resultado la activación de la caspasa 1 y el posterior procesamiento de citoquinas proinflamatorias como IL1 $\beta$  e IL18. En nuestros datos observamos activación del inflamoma dependiente de NLRP3 a través de la señalización mediada por TLR4. Pese a observar la activación de los genes

*CXCL8*, *TLR4* y *NLRP3*, vemos que el punto final de la ruta, que es la activación de la caspasa 1, no ocurre, sino que encontramos esta molécula subexpresada. Es decir, parece que los puntos iniciales de la ruta del inflamasoma *NLRP3* están activados, pero no con la intención de producir caspasa 1. Esto podría explicarse en base a datos de ciertos autores, los cuales describen que la actividad de las caspasas como mediadoras de la inflamación es muy agresiva causando graves lesiones en los tejidos afectados y que una regulación negativa de su expresión ayuda a modular y controlar la recuperación de los tejidos (Koraka et al., 2019; Toldo et al., 2016). Por ello, parece que es posible que estén actuando dos mecanismos de regulación distintos sobre la misma ruta. Por un lado, se activa la síntesis de *NLRP3* debido a la presencia de la bacteria, previamente reconocida por la ruta de señalización *TLR4*-dependiente, y, por otro lado, debe existir un punto de control de este proceso inflamatorio exacerbado. En muchos procesos de regulación, las rutas no se inhiben por falta de proteínas esenciales, sino que aun estando presentes pueden ser bloqueadas por procesos regulatorios como, por ejemplo, la ubiquitinación. Aquí es donde pueden entrar en juego la presencia de la elevada cantidad de ácidos biliares acumulados en el foco de la infección.

Recientemente se ha descrito en varios estudios el papel que tienen los ácidos biliares como moléculas de señalización perfectamente integradas en muchos procesos metabólicos. Estas evidencias, cada vez más numerosas, han demostrado que la activación mediada por los ácidos biliares es una buena estrategia para prevenir y controlar estados inflamatorios y metabólicos, aunque los mecanismos exactos aún no están bien definidos (Schaap et al., 2014). Por lo tanto, ¿podrían los ácidos biliares regular la inhibición del inflamasoma *NLRP3*? La respuesta a esta pregunta es que podrían hacerlo de manera indirecta. Esto sería posible regulando la actividad del inflamasoma a través de otra ruta metabólica, la

ubiquitinación. Algunos trabajos han descrito que la proteína NLRP3 se encuentra de manera estable pero inactivada mediante ubiquitinación de manera que cuando es necesaria su actividad, la desubiquitinación es esencial para el ensamblaje y activación del inflamasoma NLRP3 (Juliana et al., 2012; Py et al., 2013). Esto se corrobora con otros trabajos que describen sitios de fosforilación y ubiquitinación en los dominios NACHT y LRR de la proteína, lo que confirma su regulación a través de la vía de ubiquitinación (Hunter, 2007; Masters et al., 2009). En resumen, es posible que esta vía de control de la inflamación mediada por los ácidos biliares esté orientada a la recuperación del tejido gravemente afectado por la respuesta inflamatoria, y no contra la eliminación de *Salmonella*.

Otro resultado interesante presente en nuestros datos fue la inhibición del inflamasoma NLRP6. Esta ruta tiene un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis y la salud intestinal (Chen et al., 2011; Elinav et al., 2011). Un estudio demostró que ratones deficientes en *NLRP6* tenían mayor abundancia de bacterias de la familia *Prevotellaceae* (filo *Bacteroidetes*). Este cambio en la composición de la microbiota tiene importantes consecuencias fisiopatológicas, como el desarrollo de hiperplasia intestinal y una elevada infiltración celular de carácter inflamatorio (Normand et al., 2011). Otro estudio relacionado con los cambios de la microbiota tras la infección por *Salmonella* también indica un aumento de este tipo de bacterias como consecuencia de la infección (Arguello et al., 2018). Además, se ha descrito que la ausencia de NLRP6 provoca una disminución en la formación de autofagosomas que genera una exocitosis de mucina defectuosa en las células caliciformes. Esta alteración en la secreción de mucina compromete seriamente la integridad de la barrera del epitelio intestinal generando una mayor susceptibilidad a la infección persistente de *Salmonella*. Este trabajo muestra un vínculo de unión entre la regulación de la autofagia mediada por la actividad del inflamasoma, estableciendo entre

ambos procesos el mantenimiento de la estabilidad de la barrera intestinal, de la cual forma parte activa la microbiota (Wlodarska et al., 2014).

Nuestros resultados evidenciaron un bloqueo en la absorción de sales biliares a nivel de epitelio intestinal, demostrado por una represión de genes como *SLC10A2* (ASBT, principal transportador de entrada apical de sales biliares), los genes *FABP2* y *FABP6* (transportadores intracelulares de sales biliares) y FXR (*NR1H4*), regulador principal del mecanismo de retroalimentación y reciclaje de sales biliares, así como de otras moléculas implicadas (**Figura 12**). Este bloqueo en la absorción de sales biliares coincide con los datos descritos previamente por Uribe y cols (Uribe et al., 2016) en el estudio de un array de mucosa de íleon. Con nuestros datos podemos validar la gran mayoría de resultados obtenidos en este estudio como la subexpresión de los genes *ABCB1*, *ABCB10*, *APOA1*, *FABP6* y *SLC10A2* (ASBT), excepto los siguientes genes sobreexpresados (*ABCA1* y *ACSL1*) y subexpresados (*DGAT1*, *FABP1*, *NPC1L1*, *NR1I2* (*PXR*), *PNLIPRP2*, *SLC27A2*, *SLC51A*, *SLC51B* y *VDR*) que solo aparecen en nuestro estudio, apoyando la inhibición del ciclo (Uribe et al., 2016). Este hecho conllevaría un aumento de la concentración de ácidos biliares en el lumen intestinal, y al no ser absorbidos, el hígado se vería obligado a sintetizar nuevamente sales biliares para liberarlas al intestino. En el presente estudio se cuantificó la expresión de las enzimas encargadas de la síntesis en hígado, pero no se vio un aumento significativo de expresión de las enzimas encargadas de sintetizar los ácidos biliares (ej. *CYP7A1*), lo cual nos hace pensar que el mecanismo tarde en activarse y la activación sea más patente posteriormente y que a 2 d.p.i. no esté todavía completamente activado, tal y como describen estudios previos (Uribe et al., 2016) en la recuperación fisiológica del tejido a 6 días post-infección.



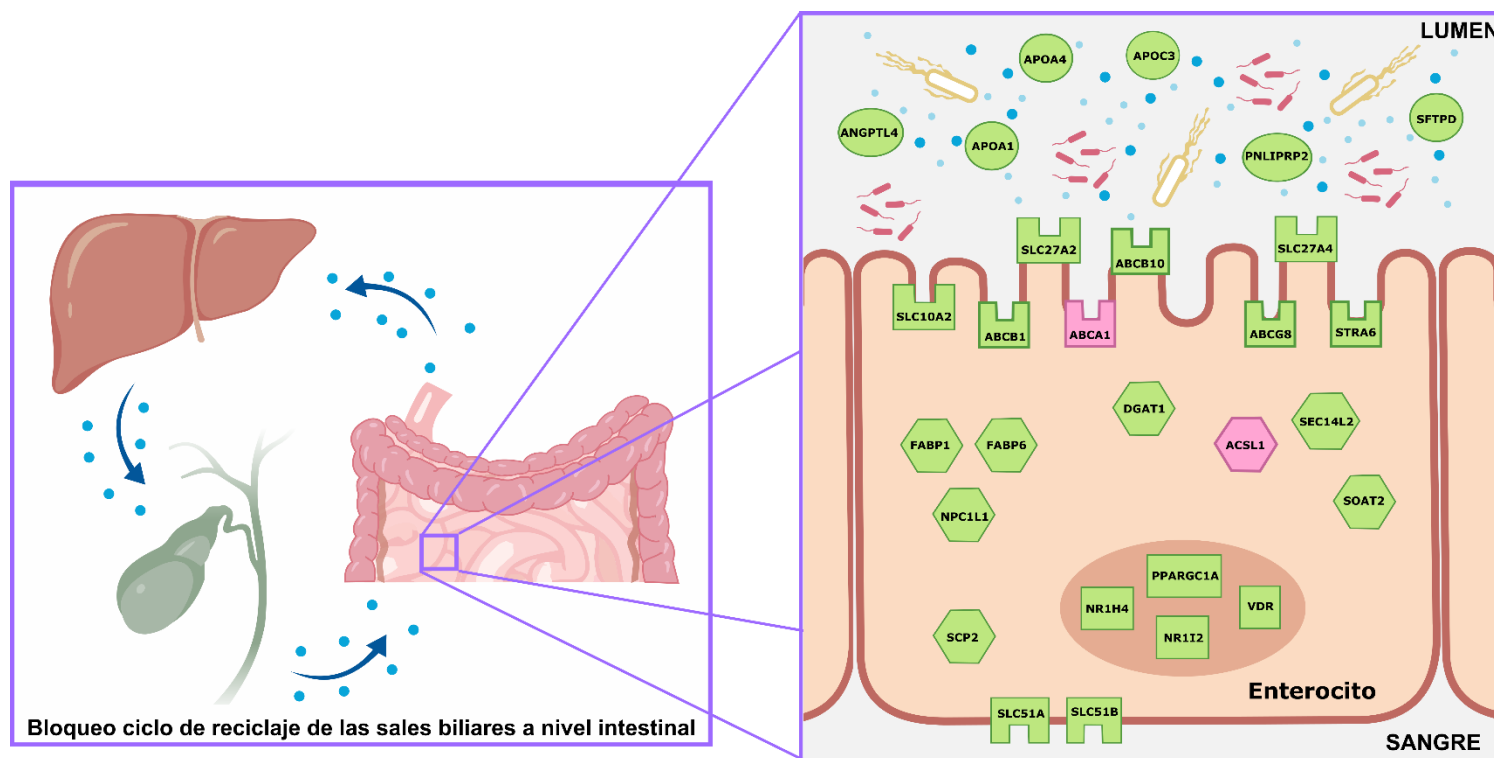


Figura 12. Modelo experimental de la modulación, ejercida por *Salmonella* sobre las células epiteliales, del ciclo de reciclaje de las sales biliares. Verde: moléculas inhibidas; Rosa: moléculas activadas.

También, la inhibición de *CYP7A1* está mediada por la activación de *FGFR4*, entre otras moléculas. En nuestro estudio dicha molécula aparece inhibida por lo que podría estar permitiendo la leve activación de *CYP7A1* (Li and Chiang, 2015).

Las predicciones a nivel transcriptómico indican que existe por tanto una desregulación funcional en este ciclo en íleon infectado. Aunque hemos discutido previamente una consecuencia positiva de la elevada presencia de los ácidos biliares como mediadores de la inflamación, participando en la activación/inactivación del inflammasoma, también tiene consecuencias negativas como la gran acumulación que se produce en la luz intestinal y los altos cambios de pH inducidos. Sin embargo, *Salmonella* es una bacteria capaz de sobrevivir en un ambiente hostil cargado de sales biliares, por lo que esta acumulación podría favorecer la supervivencia y replicación de *Salmonella* a la vez que impacta en la homeostasis de la microbiota intestinal, eliminando así a sus posibles competidores (Annaba et al., 2012; Wahlstrom et al., 2016).

La disfunción que encontramos en el ciclo de las sales biliares, en principio, se lo atribuimos a la presencia del estado inflamatorio del tejido. Esta elevada inflamación, dependiente de la activación de *TLR4*, provoca la inhibición del receptor FXR (*NR1H4*) y PPAR derivando en el aumento de expresión de los genes regulados por la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B como *IL1*, *IL6* y *TNF*, entre otros (Preidis et al., 2017; Uribe et al., 2016; Vavassori et al., 2009). Nuestros datos apoyan los obtenidos por Uribe y cols respecto a la presencia de este elevado estado inflamatorio con la excepción de los resultados obtenidos referentes a la ruta de señalización del interferón, donde nuestros resultados indican la activación de la señalización de IFN $\gamma$  y la inactivación de IFN $\alpha/\beta$ , mientras que en el estudio de Uribe y cols indican la activación de ambas (Uribe et al., 2016). El receptor nuclear FXR y *FGF-19* colaboran en el mantenimiento y control del

metabolismo biliar en el íleon; cuando los ácidos biliares se unen a FXR se induce la expresión de *FGF-19* reduciendo de esta forma la acumulación de ácidos biliares en el intestino (Moschetta, 2015). FXR, además de interactuar con estas moléculas, también lo hace con RXR, manteniendo de forma conjunta el control de la expresión de múltiples receptores y transportadores como los que vemos en nuestro estudio (Zelcer et al., 2009).

En nuestros datos el eje de regulación LXR/RXR aparece inhibido en las predicciones debido a que la mayoría de genes regulados por estas moléculas están subexpresados (genes de las familias *ABC*, *APO*, *FABP* y *SLC*). Estos efectos de activación o inhibición de *LXR* están presentes en macrófagos y en la zona intestinal, pero no en hígado (Repa and Mangelsdorf, 2002). Uno de los posibles efectos beneficiosos de inhibir esta ruta, para el patógeno, está relacionado con la presencia del colesterol y las sales biliares. Por tanto, es posible que esta inhibición que vemos, provocada por la inflamación, sea aprovechada por *Salmonella* para promover la invasión en el tejido epitelial en la zona del íleon. Se ha descrito que *Salmonella* provoca la acumulación del colesterol en las zonas donde va a comenzar el proceso de invasión en las células epiteliales, a través de efectores de la SPI-1 (Garner et al., 2019). Por tanto, tal y como indican nuestros datos, la dinámica de circulación del ciclo de las sales biliares está inhibida permitiendo un exceso de acumulación de múltiples moléculas derivadas del metabolismo biliar, que tal y como se ha descrito previamente, *Salmonella* puede aprovechar en su propio beneficio para promover un aumento de la invasión en el epitelio intestinal.

Sin embargo, aunque podamos describir estos datos gracias a la infección realizada con *Salmonella*, no existe todavía ningún trabajo en el que se afirme o que compruebe que la inhibición que vemos del metabolismo biliar esté directamente relacionada con *Salmonella*, debido a que FXR es

definido también como un regulador de la respuesta inflamatoria (Vavassori et al., 2009). Por tanto, es posible que la inhibición del metabolismo biliar sea una estrategia del sistema inmune para impedir la invasión del patógeno, debido a que la bacteria se aprovecha de los transportadores de sales biliares para inducir la invasión. Esto sería posible debido a que la invasión de *Salmonella* se ve favorecida por la presencia de acúmulos de colesterol y sales biliares en las membranas celulares (Garner et al., 2019).

Una buena estrategia de estudio sería identificar receptores regulados por la presencia de FXR, como por ejemplo ASBT (*SLC10A2*). Ambos genes se encuentran subexpresados en nuestros datos. Se ha descrito que el transportador ASBT presenta, en su región promotora, zonas complementarias a la secuencia de FXR, por lo que deducimos que la expresión de ASBT está directa o parcialmente regulada por FXR. De ser una regulación directa, donde la ausencia de FXR provoca también la ausencia de ASBT (estado que vemos reflejado en nuestros datos), se podrían estudiar formas de medir la interacción de FXR, o con mediadores de la inflamación o con la bacteria, para ver el efecto que provoca en la inhibición de moléculas relacionadas con el metabolismo biliar. Otro gen diferencialmente expresado, de la familia SLC, que obtenemos en nuestro estudio es *SLC11A1* (Log<sub>2</sub> FC: 5,17). Este gen codifica una proteína de membrana transportadora de metales de transición (hierro y manganeso). Su función principal, descrita en macrófagos, está relacionada con el metabolismo del hierro y, también, con la resistencia del hospedador frente a patógenos intracelulares. La resistencia ejercida frente a patógenos implica el secuestro de hierro y manganeso, cofactores de catalasas procariotas y eucariotas y dismutasas de superóxido, no solo para proteger a los macrófagos frente a su propia generación de ROS, sino para negar los cationes a los patógenos para la síntesis de sus enzimas protectoras (Nairz et al., 2009).

Tras obtener estos resultados de bloqueo, en el ciclo de reciclaje de las sales biliares, en la mucosa de íleon, también se estudiaron la vesícula biliar y el hígado a nivel tisular. Los resultados obtenidos indicaron la ausencia de *Salmonella* en el tejido, y por tanto la ausencia de un estado inflamatorio. Respecto al metabolismo de lípidos, observamos que también existe una regulación negativa en la mayoría de los genes estudiados por qPCR, indicando una alteración del ciclo completa y no sólo a nivel de mucosa.

Los resultados de este estudio demuestran que a la profundidad de secuenciación utilizada no es posible hacer un estudio detallado de los genes del patógeno en situaciones de infección *in vivo*. Aun así, se pudo hacer un estudio descriptivo limitado de los factores de virulencia más abundantes. Los principales que destacamos en este estudio fueron *pipB2*, *sseJ* y *sseB*. Los 3 efectores son de vital relevancia para que la bacteria pueda culminar el proceso de infección (McGhie et al., 2009). El gen *pipB2* es un efector del sistema de secreción tipo III perteneciente a la SPI-2. Su principal función se relaciona con la formación y posicionamiento de la SCV tras completar el proceso de infección en macrófagos (Baison-Olmo et al., 2012). También hay estudios que describen que este efector tiene como diana las proteínas kinesinas (kinesina 1) (Baison-Olmo et al., 2012). Esto lo podemos relacionar con la subexpresión del gen *KLC4* (kinesina 4), presente en nuestros datos. Por su parte, *sseJ* es otro efector perteneciente a la SPI-2 localizado en la zona citosólica de la SCV y cuya función radica en formar parte del conjunto de efectores encargados del mantenimiento de la propia SCV (Kolodziejek and Miller, 2015). También hay otros estudios que describen a la familia de proteína RHO (*RHO1*) como sus dianas (Kolodziejek and Miller, 2015). Finalmente, *sseB* también tiene un papel muy importante centrado en formar poros en la membrana de la SCV a través de los cuales poder translocar efectores al citoplasma de la célula hospedadora (Reynolds et al., 2014). Analizando en mayor profundidad las

lecturas obtenidas identificamos algunos genes más, potencialmente implicados en el proceso de infección. Los genes *clpA* y *clpB* implicados en la tolerancia al estrés, favoreciendo la supervivencia de la bacteria durante el proceso de infección (Sangpuui et al., 2018). *VirK* está relacionado con *Mig-14* en actuar de forma parecida otorgando a la bacteria cierta resistencia frente a péptidos antimicrobianos (Brodsky et al., 2005; Detweiler et al., 2003; Sheng et al., 2013). El haber encontrado la presencia de estos genes en los datos del perfil transcriptómico de *Salmonella* está directamente relacionado con todo lo descrito del proceso inflamatorio que indican los datos transcriptómicos del hospedador.

Posibles futuros estudios podrían ir asociados con la presencia de sales biliares durante los procesos de infección por *Salmonella*, de manera que podamos asociar si la presencia o ausencia de estas sales conlleva un efecto positivo o negativo durante el proceso de infección en las rutas metabólicas afectadas.

# **Capítulo 3**

**Estudio transcriptómico de células  
epiteliales intestinales porcinas en la  
infección *in vitro* con *Salmonella*  
Typhimurium**





## Resultados

### 1. COLONIZACIÓN DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM Y RESPUESTA INMUNE INNATA DE LA LÍNEA CELULAR EPITELIAL INTESTINAL PORCINA IPI-2I

La invasión de *Salmonella* en las células intestinales porcinas se cuantificó mediante ensayo de protección a la gentamicina (**Figura 1**). Los resultados de estos ensayos revelaron que la concentración de bacteria en el interior celular (capacidad de invasión) varió considerablemente entre los tiempos de estudio establecidos de 2, 6 y 24 horas tras la infección con *S. Typhimurium*. Así, los resultados mostraron que, aunque *Salmonella* fue capaz de invadir las células porcinas a tiempo post-infección 2 horas, la concentración de *Salmonella* en el interior celular aumentó significativamente de acuerdo con el tiempo de infección (**Figura 1**).

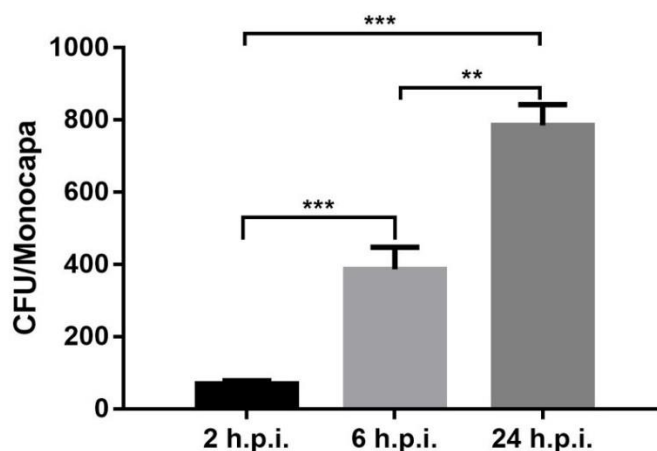


Figura 1. Ensayo de protección a la gentamicina durante 2, 6 y 24 horas de infección. Los valores son representados como unidades formadoras de colonias (UFC) por pocillo  $\pm$  desviación estándar. Valor de  $p < 0,01$  (\*\*), valor de  $p < 0,001$  (\*\*\*).

El nivel de invasión ejercido por *Salmonella* en el epitelio intestinal porcino a las 24 h.p.i. de infección fue entonces evaluado mediante microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy-TEM). Tras un ensayo de infección *in vitro* de la línea celular epitelial intestinal porcina IPI-2I, el análisis mediante microscopía electrónica nos permitió observar que *Salmonella* presenta una gran capacidad de invasión en estas células.

En la **Figura 2** se observa la presencia de la bacteria en el interior celular, caracterizada por la formación de una estructura en forma de vesícula que actúa a modo de “nicho de replicación” y favorece la supervivencia y replicación de la bacteria en el interior celular.

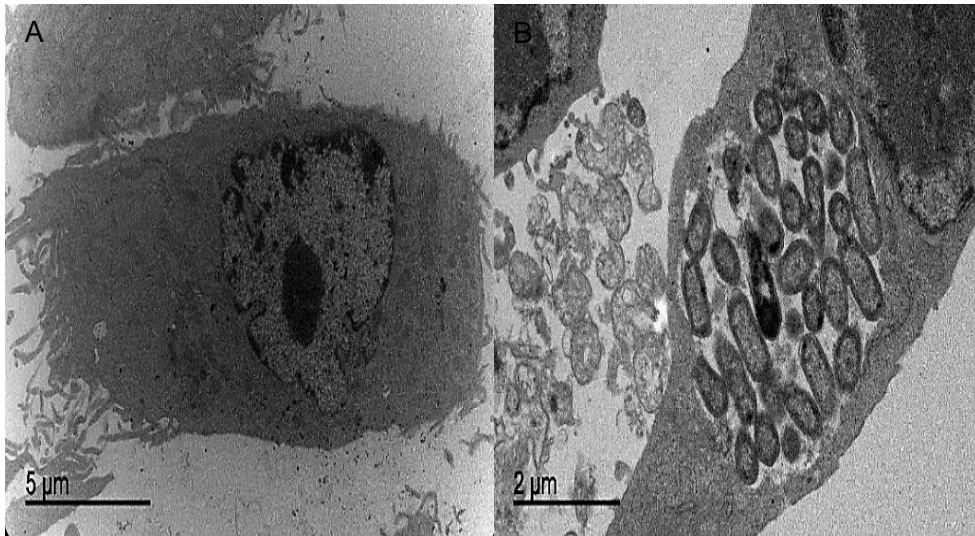


Figura 2. Análisis de la interacción de *Salmonella Typhimurium* mediante microscopía electrónica de barrido. (A) Células IPI-2I control. (B) Células IPI-2I tras 24 horas de infección.

El punto de estudio de 24 horas fue seleccionado para continuar con ensayos que nos permitiesen determinar los mecanismos mediante los que *Salmonella* consigue formar esta vesícula o “nicho de replicación intracelular”, dado que es el tiempo donde hemos observado una mayor concentración de *Salmonella* en el interior celular.

Para confirmar la activación de la respuesta inmune de las células epiteliales frente a *Salmonella*, se midió la producción de la citoquina IL8 en los sobrenadantes de cultivos *in vitro* con y sin bacteria. La citoquina IL8 es un marcador frecuentemente utilizado como activación de la respuesta inflamatoria. En nuestros datos observamos que, en general, el nivel de IL8 secretada se incrementó en las células IPI-2I infectadas con respecto a las células no infectadas (control) tras 24 horas de infección. Como se observa en la **Figura 3**, la línea IPI-2I presentó altos niveles de IL8 secretado en el medio. La media obtenida entre las tres réplicas infectadas fue de 659,6 pg/mL en comparación con un valor basal de 191,3 pg/mL de las réplicas control ( $p < 0,01$ ). Estos datos demuestran que la línea celular IPI-2I responde de forma activa frente a la presencia de *Salmonella*, indicando una activación de la respuesta inmune innata.

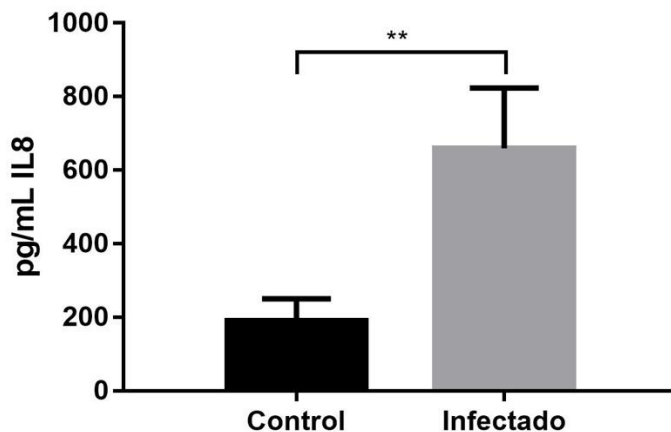


Figura 3. Concentración de IL8 en sobrenadantes de células IPI-2I infectadas con *Salmonella Typhimurium* durante 24 horas. Valores mostrados como promedio  $\pm$  la desviación estándar. Valor de  $p < 0,01$  (\*\*).

## 2. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LA LÍNEA CELULAR IPI-2I INFECTADA CON *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Se realizaron dos ensayos de infección *in vitro* de la línea celular IPI-2I con *Salmonella Typhimurium*, de los cuales se extrajo ARN para realizar un estudio de expresión génica (2 muestras IPI-2I control y 2 muestras IPI-2I infectadas). Se realizaron controles de calidad mediante Nanodrop 1000 (Thermo Fisher) y visualización en gel de agarosa, así como un análisis en Bioanalyzer (Agilent) de las muestras control y las muestras infectadas, que resultaron tener un RIN  $>9$ . Las muestras fueron unificadas en pool de controles y pool de infectados quedando solo 2 muestras finales que fueron enviadas al servicio de Secuenciación del Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona (IRB Barcelona). Una vez obtenidos los datos de secuenciación masiva, el análisis bioinformático fue llevado a cabo en el Centro de Supercomputación y Bioinnovación de la Universidad de Málaga

(SCBI-UMA). Para el análisis bioinformático, se establecieron 4 réplicas técnicas de cada muestra.

En la secuenciación se obtuvieron una media de 24.174.073 lecturas por muestra, quedando después de la limpieza y preprocesamiento una media de 11.914.218 lecturas para analizar. De esas lecturas, el 45% mapearon con el transcriptoma porcino (**Tabla 1**).

*Tabla 1. Resultados de secuenciación de ARN de IPI-2I control e infectada con S. Typhimurium. % mapeo: % de lecturas limpias que mapeaban al transcriptoma porcino.*

| Situación |            | Réplicas | Lecturas   | Lecturas limpias | % mapeo |
|-----------|------------|----------|------------|------------------|---------|
| IPI-2I    | CONTROLES  | 1        | 25.388.863 | 11.422.026       | 44,04   |
|           |            | 2        | 25.290.790 | 11.391.207       | 44,06   |
|           |            | 3        | 25.309.348 | 11.405.020       | 44,03   |
|           |            | 4        | 23.658.646 | 10.685.326       | 44,02   |
|           | INFECTADOS | 1        | 23.809.424 | 12.782.452       | 45,97   |
|           |            | 2        | 23.719.622 | 12.747.064       | 45,99   |
|           |            | 3        | 23.746.753 | 12.767.818       | 45,95   |
|           |            | 4        | 22.469.139 | 12.112.834       | 45,94   |

El análisis de expresión diferencial reveló un total de 206 transcritos diferencialmente expresados en las células IPI-2I infectadas con respecto al control. De ellos, 183 transcritos (88,8%) se encontraron sobreexpresados y 23 transcritos (11,2%) subexpresados. Estos transcritos correspondían a 143 genes anotados en la especie porcina (**Archivo suplementario IPI-2I**).

Con el objetivo de validar los resultados de secuenciación y del análisis bioinformático, se realizó qPCR en una selección de genes (**Figura 4**). El análisis de qPCR verificó la expresión diferencial de 4 genes (*IRF9*, *PSMB9*, *IL1 $\alpha$*  y *NFKB2*).

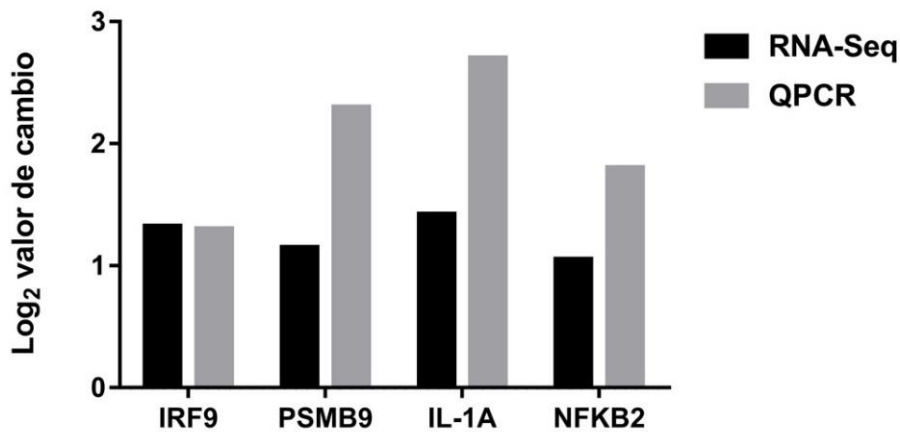


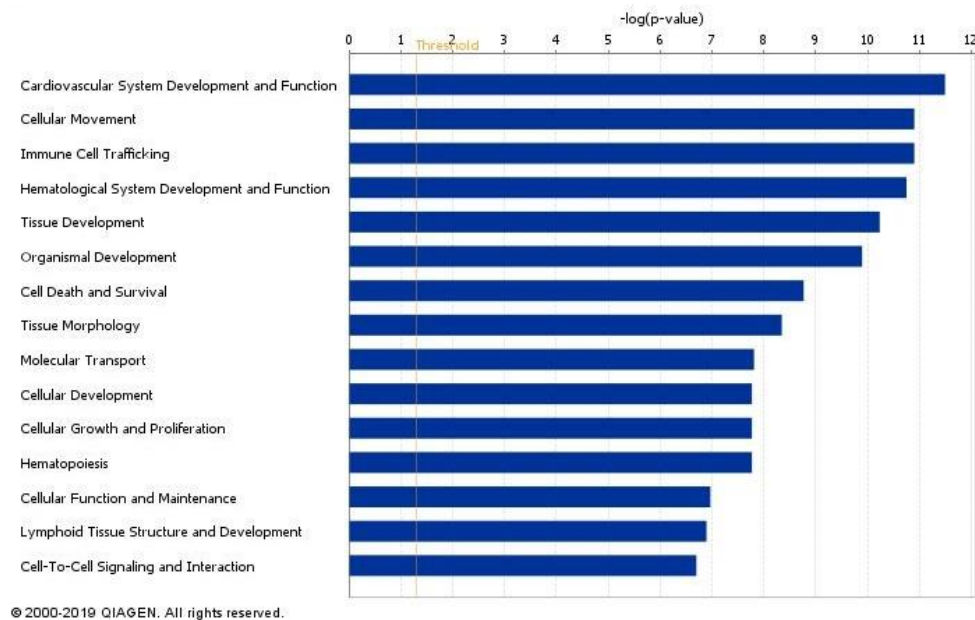
Figura 4. Validación de RNA-Seq mediante qPCR en la línea celular epitelial porcina IPI-2I infectada con *S. Typhimurium*.

Dentro de los genes con un valor de sobreexpresión más elevado se encontraron genes de respuesta inflamatoria como *CCL2*, *CXCL8* (*IL8*), *CCL20*, *NFKBIZ*, *MX1* y *OAS1* (**Tabla 2, Archivo suplementario IPI-2I**). También vimos sobreexpresados genes que codifican para metaloproteinasas (*MMP3*, *MMP7*, *MMP9*, *MMP13*). Entre los genes más reprimidos vimos varios genes de la familia de motivos tripartitos TRIM.

Tabla 2. Top 50 genes diferencialmente expresados en células IPI-2I a 24 h.p.i. Log<sub>2</sub>FC: logaritmo del valor de cambio; Genes seleccionados con FDR (valor de p corregido) <0,001; Rojo: sobreexpresión; verde: subexpresión.

| Genes        | Ensembl transcrito (cerdo) | Log <sub>2</sub> FC |
|--------------|----------------------------|---------------------|
| ABCG1        | ENSSSCT00000028391         | 1,70                |
| ACOT13       | ENSSSCT00000001189         | -1,15               |
| ADM2         | ENSSSCT00000022401         | 1,56                |
| ATG9B        | ENSSSCT00000029678         | 2,68                |
| BEX1         | ENSSSCT00000013694         | -1,16               |
| C15orf48     | ENSSSCT00000005156         | 1,83                |
| C1R          | ENSSSCT00000000733         | 2,50                |
| CCL2         | ENSSSCT00000019290         | 2,61                |
| CCL20        | ENSSSCT00000017699         | 3,01                |
| CHAC1        | ENSSSCT00000005253         | 1,60                |
| COL7A1       | ENSSSCT00000012432         | 1,84                |
| CRBN         | ENSSSCT00000012620         | -1,10               |
| CXCL8        | ENSSSCT00000034805         | 2,60                |
| CYSRT1       | ENSSSCT00000006436         | -1,03               |
| DACT2        | ENSSSCT00000004439         | 2,58                |
| DTNA         | ENSSSCT00000024859         | 1,63                |
| DYSF         | ENSSSCT00000009103         | 2,61                |
| FGF19        | ENSSSCT00000014068         | 1,70                |
| GPRC5B       | ENSSSCT00000008616         | 2,07                |
| HNMT         | ENSSSCT00000023632         | -1,06               |
| IGSF3        | ENSSSCT00000007380         | 1,93                |
| LAMA4        | ENSSSCT00000004890         | 1,61                |
| LCN2         | ENSSSCT00000006200         | 1,97                |
| LOC100737224 | ENSSSCT00000016287         | -1,08               |
| LOC102167984 | ENSSSCT00000014809         | -1,55               |
| MMP13        | ENSSSCT00000016351         | 2,80                |
| MMP3         | ENSSSCT00000016348         | 1,85                |
| MMP7         | ENSSSCT00000016344         | 1,95                |
| MMP9         | ENSSSCT00000008139         | 2,12                |
| MSMB         | ENSSSCT00000011384         | -1,11               |
| MX1          | ENSSSCT00000034038         | 2,28                |
| MYLIP        | ENSSSCT00000001158         | 1,99                |
| NFKBIZ       | ENSSSCT00000036510         | 1,79                |
| OAS1         | ENSSSCT00000010832         | 2,53                |
| PADI1        | ENSSSCT00000003867         | 1,62                |
| PLEKHA4      | ENSSSCT00000003478         | 1,67                |
| PTPRU        | ENSSSCT00000003985         | 1,73                |
| RELB         | ENSSSCT00000023149         | 1,63                |
| RND1         | ENSSSCT00000000190         | 1,61                |
| SESN2        | ENSSSCT00000022902         | 1,75                |
| SIPA1L2      | ENSSSCT00000011135         | 1,58                |
| TGFB3        | ENSSSCT00000002652         | 1,64                |
| TNFAIP3      | ENSSSCT00000004592         | 1,59                |
| TRIM43       | ENSSSCT00000030083         | -1,10               |
| TRIM61       | ENSSSCT00000009704         | -1,26               |
| TRIM64       | ENSSSCT00000016288         | -1,46               |
| TRIM77       | ENSSSCT00000022766         | -1,22               |
| UBD          | ENSSSCT00000001367         | 2,23                |
| ULK4         | ENSSSCT00000029444         | -1,08               |
| WNT5A        | ENSSSCT00000027852         | 2,94                |

Todos los genes diferencialmente expresados fueron analizados para evaluar en qué funciones biológicas estaban implicados, para poder así entender la naturaleza de la infección en este tipo celular. Tras analizar el set de datos con el programa IPA, encontramos que los genes diferencialmente expresados estaban alterando funciones biológicas relacionadas con procesos de aumento de la inflamación, respuesta inflamatoria, migración celular y supervivencia celular (**Figura 5, Archivo suplementario IPI-2I**).



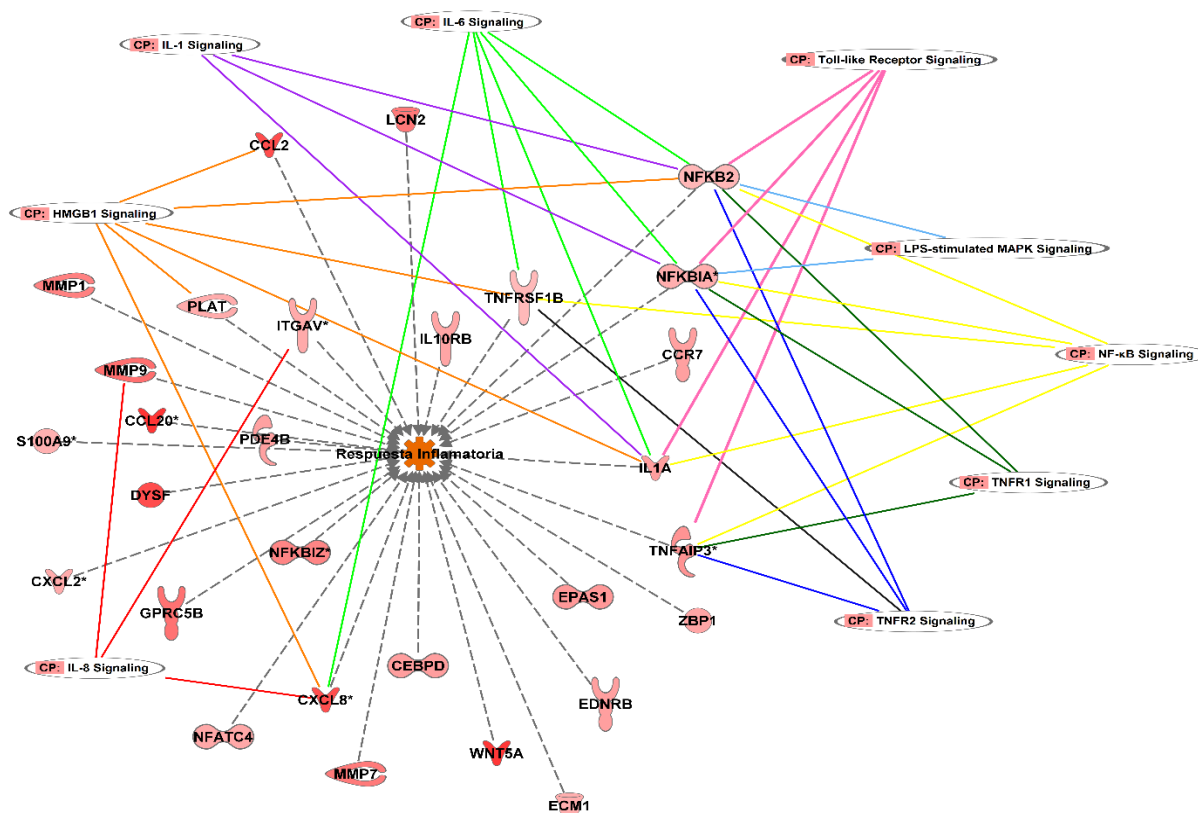
*Figura 5. Funciones biológicas afectadas por la infección de S. Typhimurium en células IPI-2I tras 24 horas de infección (top 15).*



En el análisis de rutas de señalización encontramos que la sobreexpresión de moléculas proinflamatorias hizo que se vieran afectadas varias rutas de respuesta inflamatoria (**Tabla 3, Archivo suplementario IPI-2I**). Existe un nexo común entre la mayoría mediado por la regulación de NF- $\kappa$ B. Por ejemplo, están presentes diferentes tipos de citoquinas (*IL1A* y *TNF*), quimiocinas (*CCL2*, *CCL20*, *CXCL2* y *CXCL8*) y enzimas de la familia de las metaloproteinasas (*MMP1*, *MMP7*, *MMP9* y *MMP13*), sometidas a la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B. Dicha cascada comienza con una activación de receptores TLRs dependiente iniciada por el reconocimiento de PAMPs de la bacteria. Algunos ejemplos de receptores que obtenemos en este estudio son los relacionados directamente con citoquinas como *TNFRSF1B*, *IL10RB*, y otros relacionados con activación de tipos celulares como el receptor *CCR7* directamente implicado en activar la maduración de células dendríticas (**Tabla 3**). La sobreexpresión de estas moléculas en nuestro estudio indica la activación de la respuesta inmune en la célula epitelial intestinal, que permitiría la activación y reclutamiento de células fagocíticas como macrófagos y neutrófilos. Además, es importante destacar que, aparte de la propia defensa que ejercen las células frente a la bacteria mediante la síntesis de citoquinas y quimiocinas, también encontramos rutas relacionadas con el aumento y mantenimiento del estado proinflamatorio como la activación de la ruta HMGB1 (**Tabla 3**). HMGB1 interactúa con el receptor TLR4 dando como resultado una regulación positiva de NF- $\kappa$ B, conduciendo a una mayor liberación y producción de citoquinas. Esta actividad conjunta mediada por NF- $\kappa$ B la vemos reflejada en la **Figura 6**, donde vemos que casi todas las rutas de señalización están conectadas por estas moléculas.

Tabla 3. Principales rutas de señalización afectadas por los genes diferencialmente expresados, en la línea celular epitelial porcina IPI-2I infectada por *Salmonella Typhimurium*, obtenidas mediante el software IPA. Rutas seleccionadas con valor de  $p < 0,05$

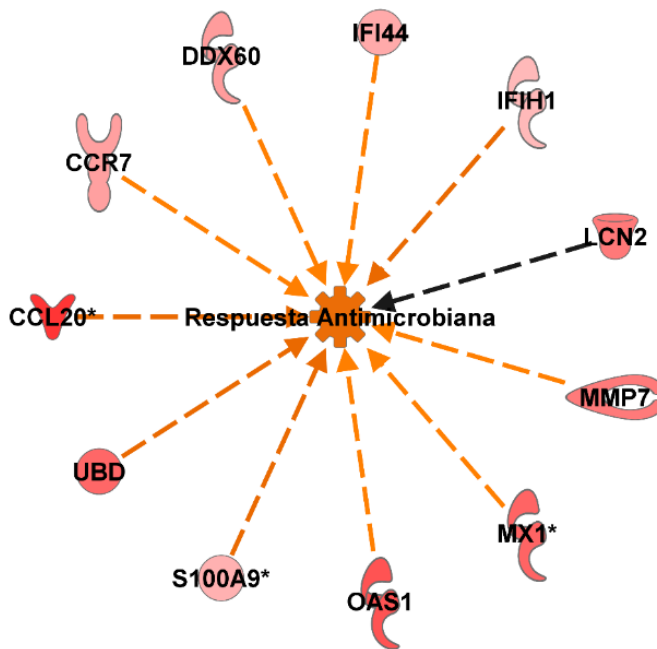
| Rutas de Señalización                         | z-score | Genes  |
|---|---------|--|
| Señalización HMGB1                            | 2,83    | CCL2,CXCL8,IL 1A,NFKB2,PLAT,RHOQ,RND1,TGFB3,TNFRSF1B,TNFSF15 |
| Maduración de células dendríticas             | 2,65    | CCR7,IL 1A,NFKB2,NFKBIA,NFKBIE,RELB,TNFRSF1B                 |
| Señalización IL6                              | 2,45    | CXCL8,IL 1A,NFKB2,NFKBIA,NFKBIE,TNFRSF1B                     |
| Señalización de receptor de células B         | 2,24    | MAP3K8,NFATC4,NFKB2,NFKBIA,NFKBIE                            |
| Señalización TNFR2                            | 2       | NFKB2,NFKBIA,NFKBIE,TNFAIP3,TNFRSF1B                         |
| Señalización IL1                              | 2       | IL 1A,NFKB2,NFKBIA,NFKBIE                                    |
| Señalización IL8                              | 2       | CXCL8,ITGAV,MMP9,RHOQ,RND1                                   |
| Señalización de respuesta de fase aguda       | 1,34    | C1R,IL 1A,NFKB2,NFKBIA,NFKBIE,TNFRSF1B                       |
| Señalización PI3K/AKT                         | 1,34    | MAP3K8,NFKB2,NFKBIA,NFKBIE,PPM1J                             |
| Señalización Apoptosis                        | 1       | NFKB2,NFKBIA,NFKBIE,TNFRSF1B                                 |
| Señalización NF- $\kappa$ B                   | 0,71    | IL 1A,MAP3K8,NFKB2,NFKBIA,NFKBIE,RELB,TNFAIP3,TNFRSF1B       |
| Formación del fagosoma                        |         | RHOQ,RND1,ULK4,ATG9B,WIPI1,ATG16L2                           |
| Autofagia                                     |         | ATG9B,WIPI1  |
| Regulación motilidad basada en actina por Rho |         | RHOQ,RND1  |
| Señalización mTOR                             |         | PPM1J,RHOQ,RND1  |
| Señalización Integrin                         |         | ITGAV,RHOQ,RND1  |
| Ruta de señalización STAT3                    |         | IL10RB,IL 1A   |
| Señalización Chemokine                        |         | CCL2   |
| Maduración del fagosoma                       |         | RILP   |
| Señalización PPAR                             | -2,24   | IL 1A,NFKB2,NFKBIA,NFKBIE,TNFRSF1B                           |
| Activación LXR/RXR                            | -2,45   | ABCG1,CCL2,IL 1A,MMP9,MYLIP,NFKB2,TNFRSF1B                   |



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 6. Red de interacción entre moléculas relacionadas con la activación de respuesta inflamatoria. Las moléculas en color rojo indican sobreexpresión, y el color naranja indica predicción de activación de la respuesta inflamatoria.

Es interesante destacar respuesta antimicrobiana, determinada por la sobreexpresión del gen S100A9, de la familia de proteínas (**Figura 7**). Este tipo de moléculas suelen estar producidas por las células fagocíticas, por lo que es muy interesante describir que una célula epitelial pueda también producirlas durante un proceso de infección.



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 7. Moléculas sobreexpresadas en IPI-2I infectadas con *S. Typhimurium* relacionadas con la activación de la respuesta antimicrobiana.

### 3. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

En la secuenciación de RNA de la bacteria (ya que éste es un estudio Dual RNA-Seq) se obtuvieron una media de 37.130 lecturas de *Salmonella*, quedando después de la limpieza y preprocesamiento una media de 36.113 lecturas para analizar. Del análisis de expresión diferencial se obtuvieron un total de 2.795 transcritos, de los cuales 1.146 se encontraron sobreexpresados y 1.649 subexpresados. Se realizó un filtrado por número de lecturas, eliminando los transcritos que presentaban menos de 10 lecturas en las muestras infectadas, manteniendo así los de mayor representación en el proceso de infección. Tras este filtro por número de lecturas, todos los transcritos que quedaron (n=525) se encontraban sobreexpresados, estando 322 de ellos anotados en el genoma y por tanto se pudo continuar con el análisis funcional.

Para validar los datos de secuenciación, se realizó qPCR de una selección de genes diferencialmente expresados (**Figura 8**). El análisis de qPCR verificó la expresión diferencial de los 4 genes seleccionados (*avrA*, *sopD2*, *sifA* y *sseJ*).

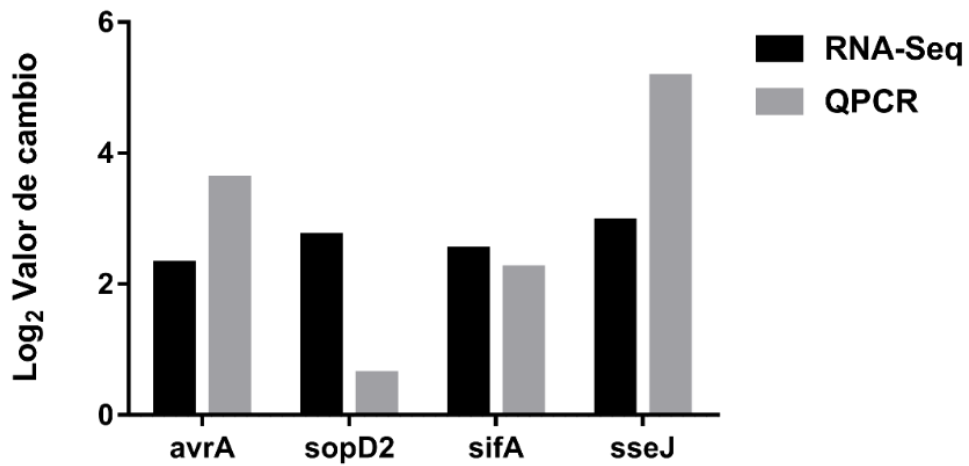
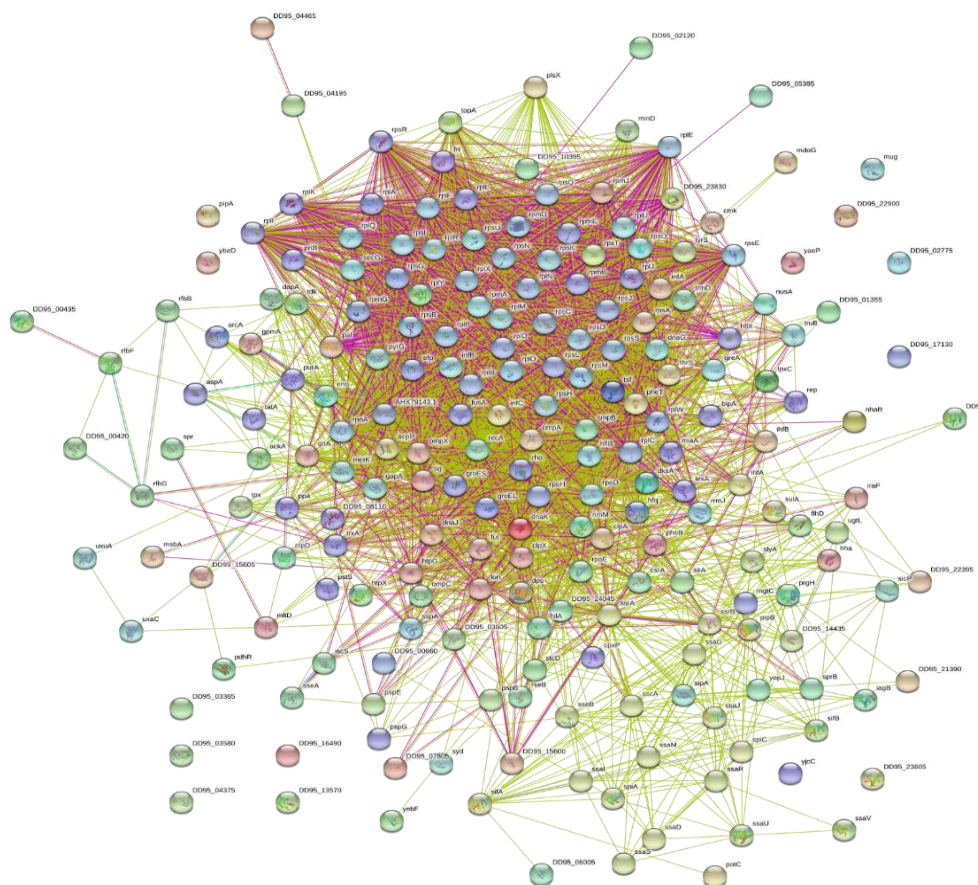


Figura 8. Validación de RNA-Seq mediante qPCR de *S. Typhimurium* durante la infección de la línea celular porcina IPI-21.

La **Figura 9** muestra una red de asociación funcional de genes de *Salmonella* diferencialmente expresados.



*Figura 9. Interacción entre proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados de Salmonella Typhimurium durante la infección de las células IPI-2I. Rosa: conexión establecida mediante experimentos; Amarillo: conexión establecida mediante bibliografía.*

La función de los genes diferencialmente expresados se asoció a patogenicidad (**tabla 4**), motilidad y quimiotaxis, proteínas de membrana exterior, sistemas de dos componentes, metabolismo y transporte de carbohidratos, transporte de aminoácidos, metabolismo del tetrionato,

proteínas relacionadas con adaptación de choque térmico y resistencia a antibióticos, entre otras (**archivo suplementario IPI-2I-*Salmonella***).

Tabla 4. Genes involucrados en diferentes funciones biológicas, incluyendo el  $\log_2$  de su valor de cambio (FC).

|   | ID           | Descripción  | Log <sub>2</sub> FC |
|---|--------------|--|---------------------|
| <b>Send03070 Sistema de secreción bacteriana (11 genes)</b>           | <i>prlA</i>  | Pre-proteína translocasa                                     | 5,06                |
|   | <i>secG</i>  | Proteína de membrana exportadora                             | 4,25                |
|   | <i>spiA</i>  | Supuesta proteína secretora de membrana externa              | 5,45                |
|   | <i>ssaG</i>  | Supuesta proteína de SPI                                     | 8,31                |
|   | <i>ssaJ</i>  | Supuesta lipoproteína de SPI                                 | 8,64                |
|   | <i>ssaS</i>  | Supuesta proteína de secreción tipo III                      | 6,77                |
|   | <i>ssaT</i>  | Supuesta proteína de secreción tipo III                      | 7,13                |
|   | <i>ssaU</i>  | Supuesta proteína de secreción tipo III                      | 4,95                |
|   | <i>ssaV</i>  | Supuesta proteína de secreción tipo III                      | 6,03                |
|   | <i>tatA</i>  | Proteína translocasa   | 5,34                |
|   | <i>vscR</i>  | Supuesta proteína de secreción tipo III                      | 9,61                |
| <b>Send05132 Infección por <i>Salmonella</i> (10 genes)</b>           | <i>avrA</i>  | Proteína efectora secretada                                  | 4,95                |
|   | <i>fliC</i>  | Flagelina tipo 1   | 2,23                |
|   | <i>pipB2</i> | Proteína efectora secretada                                  | 6,21                |
|   | <i>sifA</i>  | Proteína efectora  | 5,72                |
|   | <i>sipA</i>  | Proteína efectora de SPI-1                                   | 2,82                |
|   | <i>sseB</i>  | Proteína efectora de SPI                                     | 5,75                |
|   | <i>sseC</i>  | Proteína efectora de SPI                                     | 4,77                |
|   | <i>sseJ</i>  | Proteína efectora translocada                                | 7,76                |
|   | <i>stpP</i>  | Proteína tirosina fosfatasa                                  | 6,28                |
|   | <i>vieB</i>  | Proteína hipotética conservada                               | 3,64                |
| <b>Send00540 Biosíntesis de Lipopolisacárido (5 genes)</b>            | <i>lpxC</i>  | UDP-3-O-[3-hidroximiristoil]N-acetilglucosamina desacetilasa | 5,22                |
|   | <i>waaB</i>  | lipopolisacárido 1,6-galactosiltransferasa                   | 3,63                |
|   | <i>waaI</i>  | lipopolisacárido 1,3-galactosiltransferasa                   | 3,49                |
|   | <i>waaJ</i>  | lipopolisacárido 1,2-galactosiltransferasa                   | 2,38                |
|   | <i>waaZ</i>  | proteína de biosíntesis de núcleo de lipopolisacárido RfaZ   | 3,36                |
| <b>Send05100 Invasión bacteriana de células epiteliales (2 genes)</b> | <i>sipA</i>  | Proteína efectora de SPI-1                                   | 2,82                |
|   | <i>stpP</i>  | Proteína tirosina fosfatasa                                  | 6,28                |
| <b>Send02040 Ensamblaje flagelar (2 genes)</b>                        | <i>flhD</i>  | Activador transcripcional                                    | 5,13                |
|   | <i>fliC</i>  | Flagelina tipo 1   | 2,23                |



Muchas bacterias patógenas pueden invadir células fagocíticas y no fagocíticas y colonizarlas intracelularmente, y luego diseminarse a otras células. Las bacterias inducen su endocitosis por las células del hospedador no fagocíticas, por ejemplo, las células epiteliales. *Salmonella* invade las células utilizando un sistema con forma de aguja (sistema de secreción tipo III), mediante el cual inyecta proteínas efectoras que reorganizan la conformación de la célula hospedadora interactuando con el citoesqueleto de actina y con otras moléculas, modulando así la respuesta celular. Estas proteínas que la bacteria usa para infectar se denominan factores de virulencia. Mediante la herramienta PATRIC identificamos los genes que codifican para factores de virulencia en nuestro set de datos diferencialmente expresados. En la **Tabla 5** se incluyen todos aquellos genes de virulencia y diferencialmente expresados encontrados en el presente estudio. En la **Figura 10** se representa la interacción funcional de estos genes y en la **Figura 11** únicamente los genes de virulencia localizados en las SPI-1 y SPI-2 y las funciones con las que se relacionan.

Tabla 5. Grupo de genes diferencialmente expresados identificados como factores de virulencia de *Salmonella*, y su valor de cambio expresado en  $\log_2$ .

| ID            | SPI | Descripción  | Log <sub>2</sub> FC |
|---------------|-----|--|---------------------|
| <i>avrA</i>   | 1   | Proteína efectora secretada                              | 4,95                |
| <i>fimY</i>   | 1   | Supuesta proteína reguladora                             | 4,42                |
| <i>hilA</i>   | 1   | Activador transcripción de proteínas de invasión         | 2,87                |
| <i>hilC</i>   | 1   | Proteína reguladora de invasión                          | 5,22                |
| <i>iagB</i>   | 1   | Proteína de invasión                                     | 4,38                |
| <i>invF</i>   | 1   | Proteína de invasión                                     | 4,68                |
| <i>prgH</i>   | 1   | Proteína efectora  | 2,87                |
| <i>sicP</i>   | 1   | Chaperona para sptP                                      | 8,11                |
| <i>sipA</i>   | 1   | Proteína efectora de actina                              | 2,82                |
| <i>sprB</i>   | 1   | Regulador transcripcional                                | 3,97                |
| <i>pipA</i>   | 2   | Proteína efectora  | 4,1                 |
| <i>pipB</i>   | 2   | Proteína efectora  | 6,31                |
| <i>pipB2</i>  | 2   | Proteína efectora  | 6,21                |
| <i>sifA</i>   | 2   | Proteína efectora  | 5,72                |
| <i>sifB</i>   | 2   | Proteína efectora  | 7,47                |
| <i>sopD2</i>  | 2   | Proteína efectora  | 6,63                |
| <i>spiA</i>   | 2   | Proteína efectora  | 5,45                |
| <i>spiC</i>   | 2   | Proteína efectora  | 8,13                |
| <i>spvD</i>   | 2   | Proteína D del plásmido de virulencia                    | 3,46                |
| <i>ssaD</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 5,73                |
| <i>ssaG</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 8,31                |
| <i>ssaI</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 7,06                |
| <i>ssaJ</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 8,64                |
| <i>ssaL</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 6,19                |
| <i>ssaM</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 8,81                |
| <i>ssaS</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 6,77                |
| <i>ssaT</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 7,13                |
| <i>ssaU</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 4,95                |
| <i>ssaV</i>   | 2   | Proteína de virulencia                                   | 6,03                |
| <i>sscA</i>   | 2   | Chaperona A del sistema de secreción                     | 4,02                |
| <i>sseA</i>   | 2   | Proteína efectora  | 6,35                |
| <i>sseB</i>   | 2   | Proteína efectora  | 5,75                |
| <i>sseC</i>   | 2   | Proteína efectora  | 4,77                |
| <i>sseJ</i>   | 2   | Proteína efectora  | 7,76                |
| <i>ssrA</i>   | 2   | Histidina quinasa A                                      | 5,2                 |
| <i>ssrB</i>   | 2   | Histidina quinasa B                                      | 6,59                |
| <i>fliC</i>   |     | Flagelina tipo 1   | 2,23                |
| <i>gtgE</i>   | 2   | Cisteína proteasa  | 5,02                |
| <i>mgtB</i>   |     | Proteína transportadora de Mg <sup>+2</sup>              | 2,41                |
| <i>mgtC</i>   |     | Proteína transportadora de Mg <sup>+2</sup>              | 3                   |
| <i>mig-14</i> |     | Proteína de resistencia a péptidos antimicrobianos       | 7,09                |
| <i>pefB</i>   |     | Proteína reguladora de fimbrias codificada por plásmidos | 5,85                |
| <i>safA</i>   |     | Proteína de fimbria                                      | 4,62                |
| <i>sodCI</i>  |     | Superóxido dismutasa                                     | 6,67                |
| <i>spvR</i>   |     | Proteína R del plásmido de virulencia                    | 4,27                |
| <i>stcC</i>   |     | Supuesta proteína reguladora C                           | 3,3                 |
| <i>stcD</i>   |     | Supuesta proteína reguladora D                           | 4,59                |



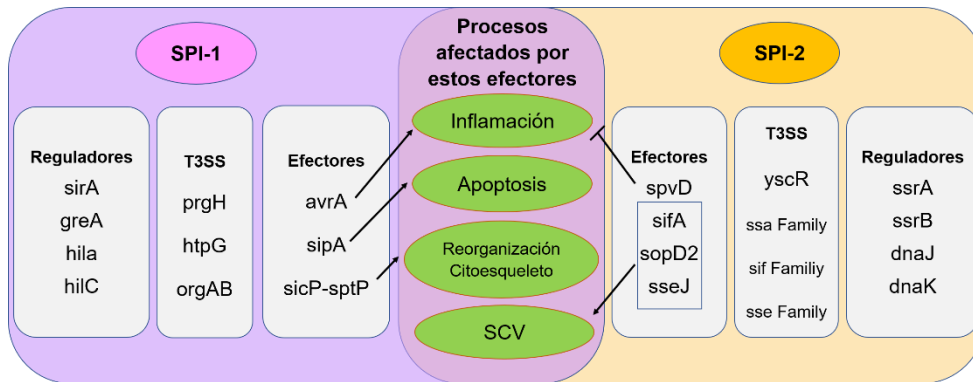


Figura 11. Esquema de los principales genes de *Salmonella* asociados a las islas de patogenicidad 1 (SPI-1) y 2 (SPI-2) sobreexpresados en este estudio.

Se detectaron un total de 11 genes de la SPI-1 y 12 genes de la SPI-2, todos ellos sobreexpresados. Estos genes de virulencia se asocian a inflamación (activadores e inhibidores), activación de la apoptosis, reorganización del citoesqueleto y formación de la vacuola de *Salmonella* funciones que se pueden asociar a los procesos que hemos descrito en la célula hospedadora (**archivos suplementarios IPI-2I y IPI-2I-*Salmonella***).

#### 4. ¿ESTÁ LA RUTA DE AUTOFAGIA INVOLUCRADA EN LA FORMACIÓN DEL NICHOS DE REPLICACIÓN DE *SALMONELLA*?

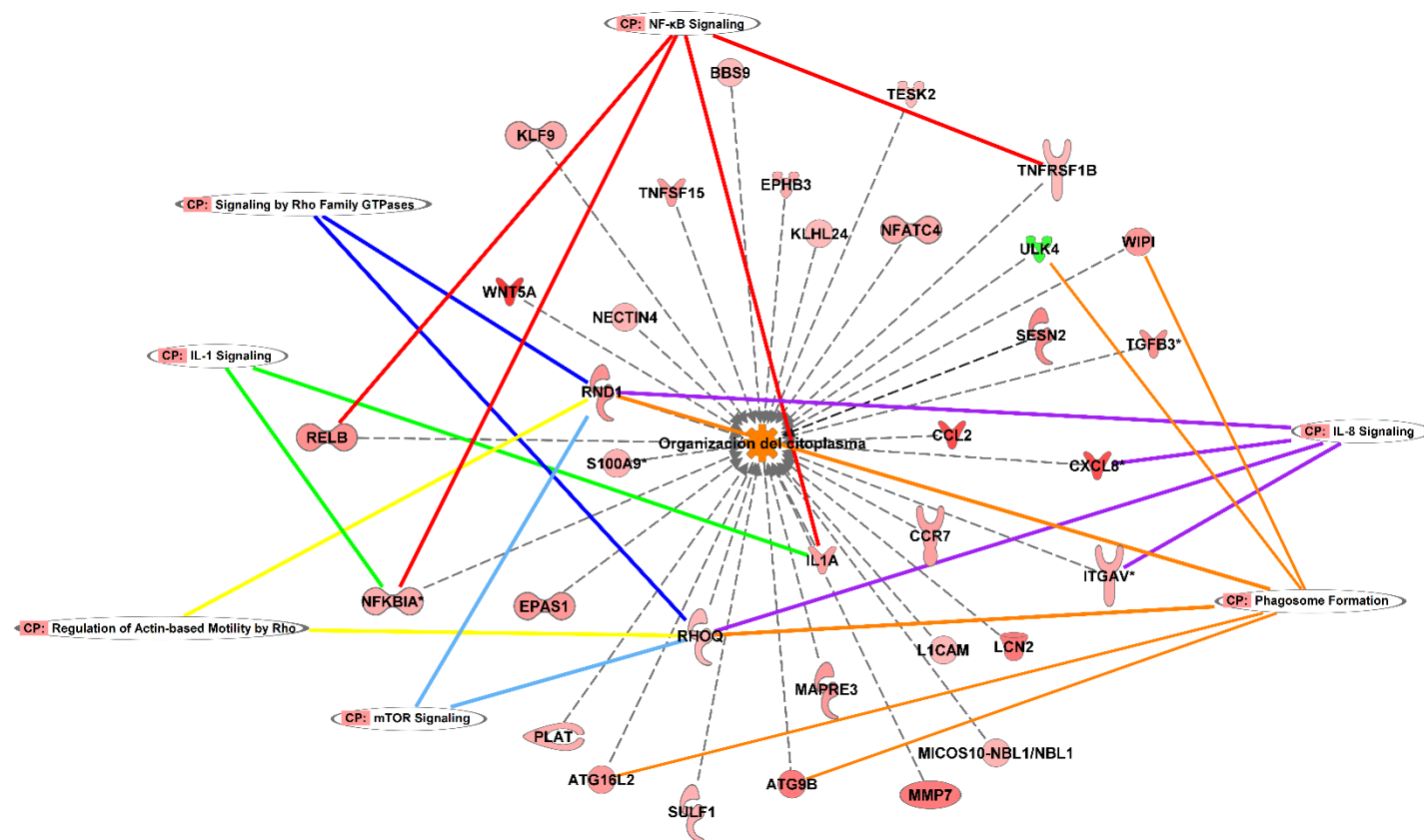
Dado que en el estudio de TEM habíamos identificado la presencia de vesículas intracelulares con bacterias en su interior (**Figura 2 B**), se procedió a investigar los genes y rutas de señalización que podrían estar implicadas en la remodelación de la arquitectura celular y que podrían estar involucradas en la formación de dicha vesícula. Por ello se analizaron las

rutas, funciones y redes de interacción relacionadas con reorganización del citoesqueleto y el citoplasma celular (**Tabla 3, Archivo suplementario IPI-2I**). Dicho análisis reveló la desregulación de una serie de genes involucrados en diferentes etapas del proceso de autofagia (**Tabla 6**).

*Tabla 6. Genes diferencialmente expresados relacionados con el proceso de autofagia obtenidos de los datos de RNA-Seq. FC: valor de cambio.*

| Genes                | Log <sub>2</sub> FC |
|----------------------|---------------------|
| <b>ATG9B</b>         | 2,68                |
| <b>ATG16L2</b>       | 1,22                |
| <b>WIPI1 (ATG18)</b> | 1,13                |
| <b>ULK4</b>          | -1,08               |

La autofagia es un proceso altamente conservado en la evolución de los organismos eucariotas, mediante el cual los materiales citoplasmáticos se degradan mediante la unión a lisosomas. Mientras que los genes ATG son responsables de mantener y aumentar el tamaño del autofagosoma, las proteínas ULK están involucradas en la formación del complejo iniciador de la formación de la membrana del fagosoma (**Tabla 3**). Buscando en qué tipo de rutas y funciones están involucrados estos genes descubrimos que no parecen estar tan aislados y que presentan cierta conexión con el proceso inflamatorio descrito previamente. Esta conexión la vemos en la **Figura 12** donde observamos que la señalización mediada por NF- $\kappa$ B, IL1 e IL8 están relacionadas con la señalización mTOR, RHO GTPasas, regulación de actina y formación del fagosoma.



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 12. Moléculas sobreexpresadas en IPI-2I infectadas con *S. Typhimurium* relacionadas con la organización del citoplasma.

Para estudiar si la bacteria regula la autofagia en su propio beneficio, se diseñaron diferentes experimentos de invasión usando un conocido y ampliamente utilizado inhibidor de la ruta de autofagia, 3-MA, en diferentes tiempos tras la infección con *Salmonella* Typhimurium cepa SL1344 (2h, 6h y 24h).

En primer lugar, se realizó un ensayo para comprobar la toxicidad del 3-MA a la concentración empleada de 5 mM mediante el reactivo MTT en nuestras células epiteliales. Los resultados obtenidos indicaron que las células con y sin inhibidor estaban vivas y no se vieron diferencias que indicaran toxicidad por parte del 3-MA (**Figura 13**).

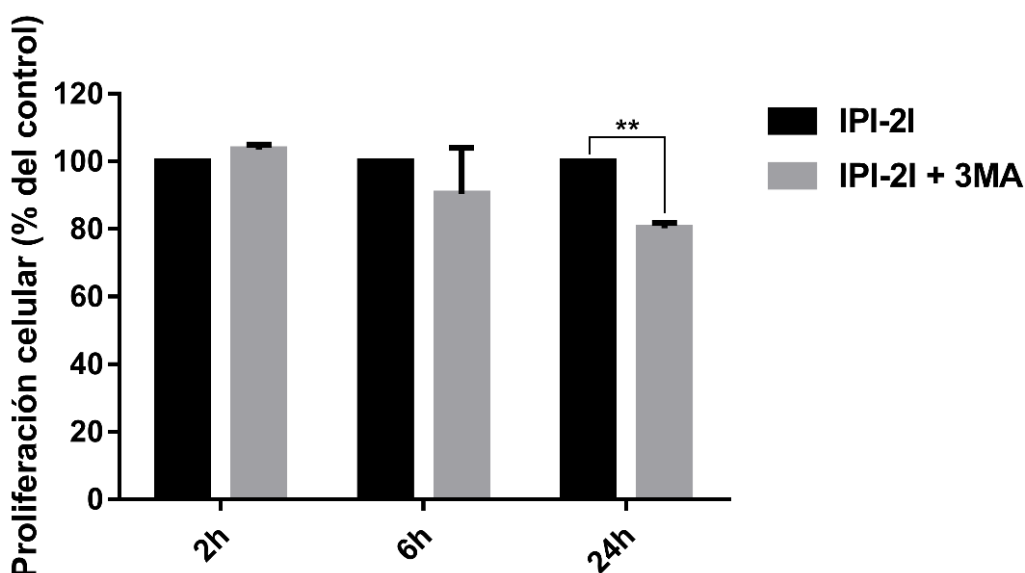


Figura 13. Efecto del inhibidor 3-MA (5 mM) en las células IPI-2I a 2, 6 y 24 horas. Valor de  $p < 0,01$  (\*\*).

Una vez comprobada la ausencia de citotoxicidad del inhibidor en células epiteliales, decidimos investigar el efecto de la inhibición de la autofagia en la infección de *Salmonella* en nuestras células de estudio. Este inhibidor interrumpe la ruta de la autofagia en los primeros pasos de la formación del fagosoma (Wu et al., 2010). Nuestras células epiteliales fueron crecidas en medio de cultivo estándar y el inhibidor fue utilizado a una concentración de 5 mM. Los resultados fueron analizados de dos maneras: mediante el uso del lector de placas (en base a la cantidad de bacteria teñida con FITC) y mediante análisis de qPCR con sonda TaqMan (específica de *Salmonella*).

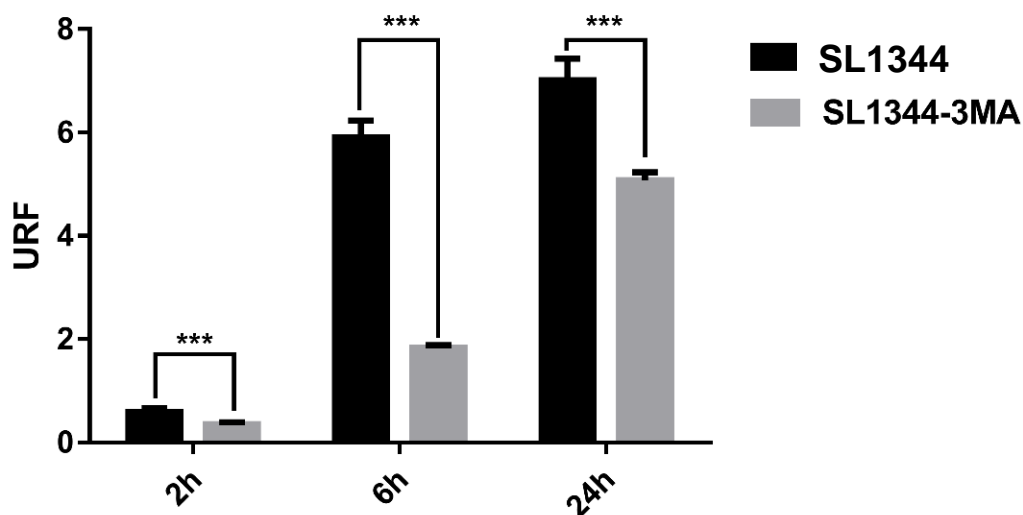


Figura 14. Análisis a distintos tiempos de la invasión de células IPI-2I por *Salmonella Typhimurium* (cepa SL1344) utilizando el inhibidor 3-MA. Intensidad de fluorescencia obtenida a través de la cuantificación del lector de placas de las bacterias con (SL1344-3MA) y sin 3-MA (SL1344) expresados en URF (unidades relativas de fluorescencia). Valores mostrados en unidades relativas de fluorescencia. Valor de  $p < 0,001$  (\*\*\*).



Los resultados obtenidos mostraron una clara disminución en el número de bacterias en los diferentes puntos de estudio, comparado con las muestras sin inhibidor (**Figuras 14 y 15**). Estos datos respaldan nuestra hipótesis de que *Salmonella* modula la vía de la autofagia en su propio beneficio durante el proceso de infección de las células IPI-2I.

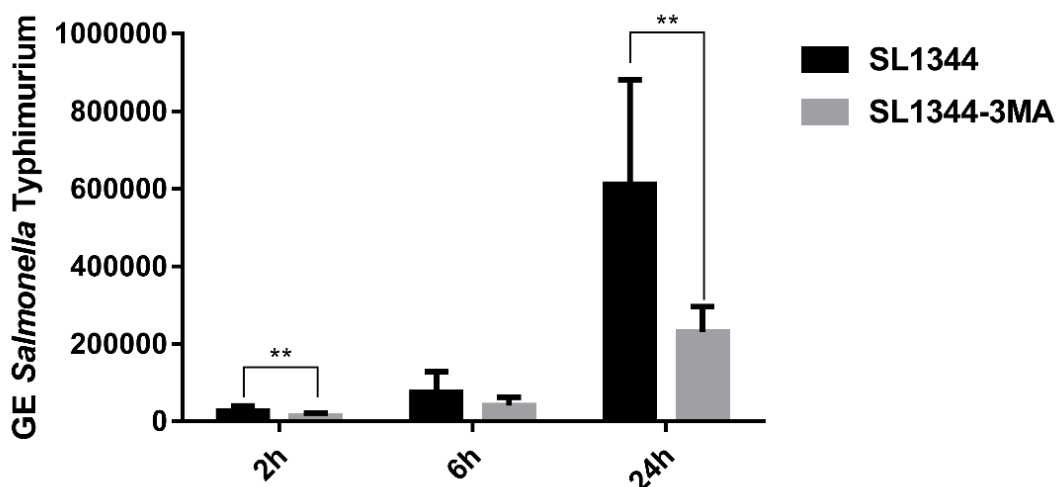


Figura 15. Análisis a distintos tiempos de la invasión de células IPI-2I por *Salmonella Typhimurium* utilizando el inhibidor 3-MA. Número de equivalentes de genomas (GE) obtenidos mediante la cuantificación por sonda TaqMan con (SL1344-3MA) y sin 3-MA (SL1344). Valor de  $p < 0,01$  (\*\*).

Durante la formación y maduración del autofagosoma se produce la incorporación de la molécula LC3 a la membrana. Para ello LC3 sufre un proceso de conjugación lipídica pasando por 3 fases (LC3-LC3I-LC3II), de manera que pasa de ser una molécula citosólica a formar parte de las membranas de los fagosomas. Este hecho hace que se tome la medida de esta molécula como un indicador positivo de la actividad del proceso de

autofagia, ya que en casos de inhibición de la ruta la molécula no se incorpora en las membranas permaneciendo en su forma libre citosólica.

Por tanto, y en adición a los resultados anteriores, comprobamos mediante microscopía confocal la localización de la bacteria en el citoplasma celular (**Figura 16**) acompañada de la presencia de la molécula LC3 en dos situaciones diferentes, con y sin inhibidor de autofagia 3-MA. Los resultados obtenidos en las muestras infectadas en ausencia del inhibidor 3-MA indican una mayor acumulación de *Salmonella* en el citoplasma (**Figura 16 A**), acompañada de una localización de LC3 mayoritariamente citoplasmática, probablemente formando parte de las vesículas autofágicas (**Figura 17 A y 17 B**). En la situación de inhibición de la autofagia, mediante el uso del inhibidor 3-MA, los resultados obtenidos indican una clara disminución de *Salmonella* (**Figura 16 B**) acompañada de la acumulación de la molécula LC3 tanto a nivel nuclear como citoplasmático (**Figura 18**).

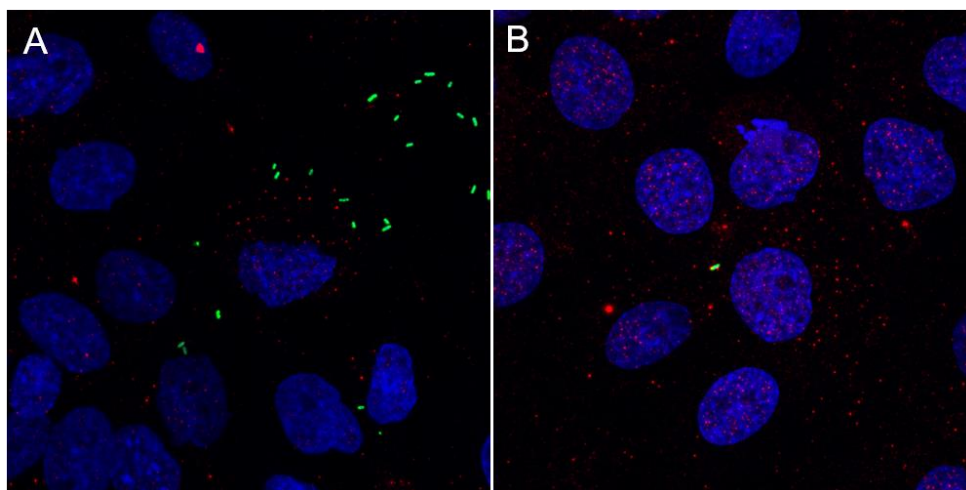


Figura 16. Efecto del inhibidor 3-MA durante el proceso de infección. La presencia del inhibidor 3-MA durante 6 horas provoca una reducción en la invasión bacteriana. (A) Línea celular IPI-2I infectada con *Salmonella Typhimurium* (B) Línea celular IPI-2I infectada con *Salmonella Typhimurium* en presencia del inhibidor de 3-MA. Azul: núcleos marcados con DAPI; Rojo: molécula LC3; Verde: bacteria marcada con FITC.

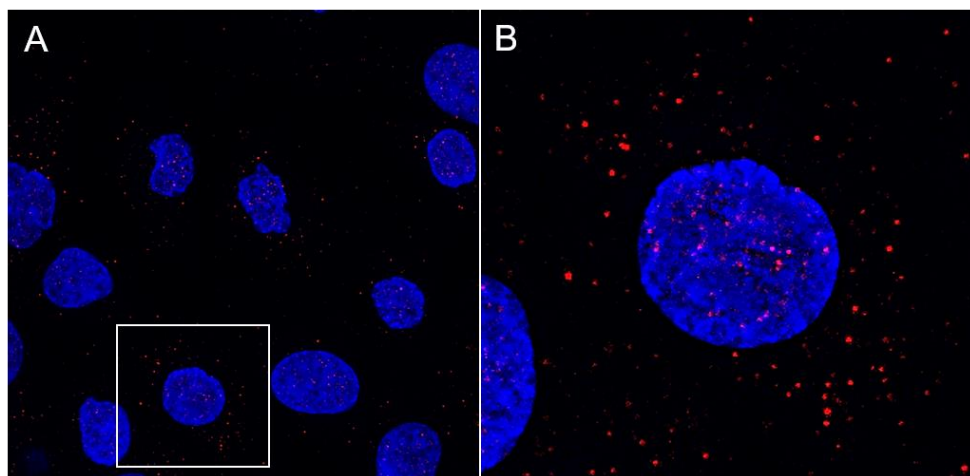


Figura 17. Marcaje de LC3 en células IPI-2I control. (A) Control línea celular IPI-2I. (B) Control línea celular IPI-2I zoom. Azul: núcleos marcados con DAPI; Rojo: molécula LC3.

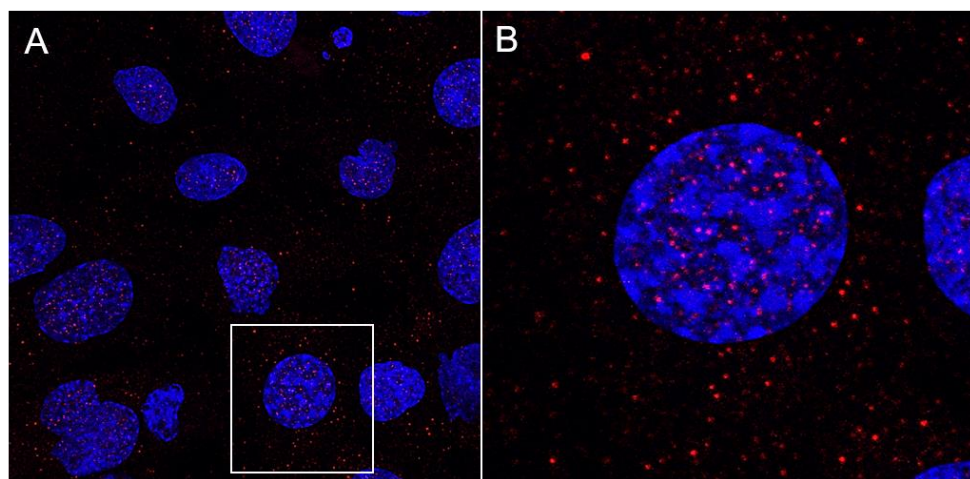


Figura 18. Marcaje de LC3 en células IPI-2I tratadas con 3-MA. (A) Línea celular IPI-2I tratada durante 6 horas con 3-MA. (B) Línea celular IPI-2I tratada durante 6 horas con 3-MA zoom. Azul: núcleos marcados con DAPI. Rojo: molécula LC3.

Estos datos obtenidos acerca de la presencia de *Salmonella* en el citoplasma celular coinciden con los valores de cuantificación bacteriana mostrados previamente. Además, mediante la técnica western blot con anticuerpos específicos para la proteína LC3, también observamos la tendencia a la acumulación de la molécula LC3 en las células tratadas con el inhibidor 3-MA (**Figura 19 A**), observada previamente en las imágenes de confocal. También fue realizado un análisis de recuento de partículas de dichas imágenes, observando dicha tendencia (**Figura 19 B**), lo que podría explicarse por la no estabilización del fagosoma. Serían necesarias más imágenes para confirmar esta tendencia.

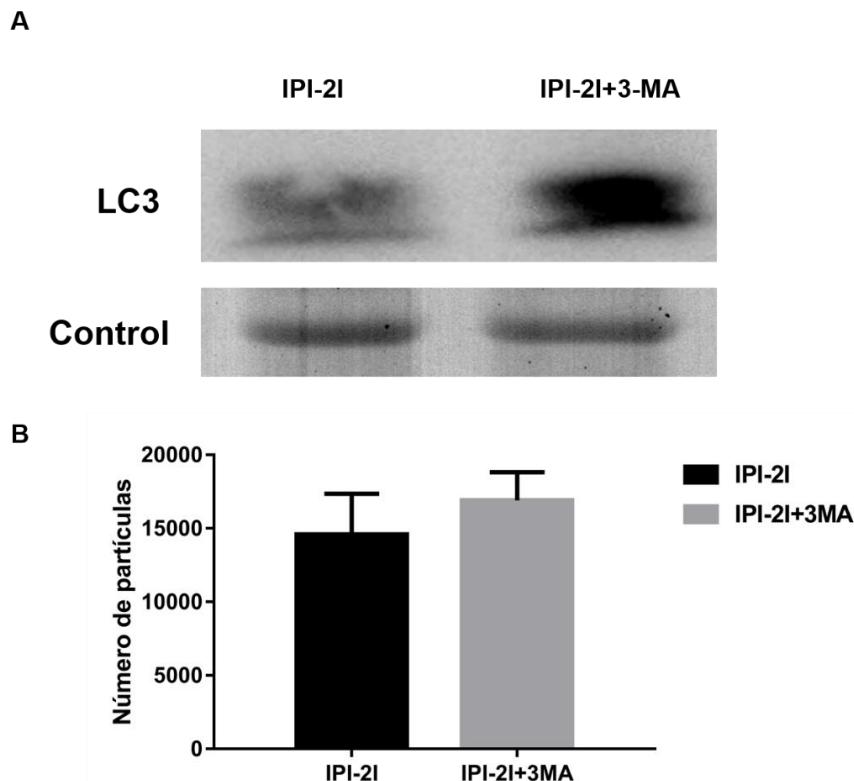


Figura 19. Cuantificación de la molécula LC3. (A) Western-blot junto con su control de carga (gel coomassie), y (B) Análisis de las imágenes de confocal (ImageJ-particles análisis) ( $p > 0,05$  no significativo).

## Discusión

El presente estudio muestra la utilidad de la tecnología dual RNA-Seq en la investigación de la interacción patógeno-hospedador. Las bacterias patógenas han desarrollado una gran variedad de estrategias para superar o evitar los mecanismos de defensa del hospedador. Dichas estrategias son de vital importancia para que una bacteria se defina como un “patógeno con éxito”. Escapar de la degradación mediada por lisosomas es una de las claves para que cualquier patógeno intracelular, como *Salmonella* Typhimurium, sobreviva en el interior de la célula hospedadora. El mecanismo o mecanismos mediante los que *Salmonella* puede escapar de la degradación lisosomal no están descritos con precisión. En este estudio aportamos nueva información integrando análisis transcriptómicos tanto del hospedador (línea celular IPI-2I) como del patógeno (*Salmonella* Typhimurium) acompañados de estudios funcionales *in vitro*.

Nuestros resultados demuestran, en primer lugar, que las SCV no contienen una única bacteria en su interior tal y como afirman otros autores (Eswarappa et al., 2010). Mediante nuestro ensayo *in vitro* observamos que, tras 24 horas post-infección, ocurre una multiplicación de *Salmonella* dentro de los enterocitos. La interacción que existe entre las células del epitelio intestinal y *Salmonella* tiene un papel clave en cómo se inicia la respuesta inmune por parte del hospedador, ya que las células actúan como una primera barrera física. Además, las células epiteliales, por sí mismas, ejercen una respuesta de defensa y de reconocimiento de patógenos. Tras el análisis de las imágenes de TEM, vemos que se produce una clara respuesta inflamatoria provocada por el proceso de infección donde obtenemos unos elevados niveles de citoquina IL8. Además, tras los análisis de los datos de transcriptómica, comprobamos que la producción

de citoquinas como IL1, IL6, IL8 y TNF, entre otras, era mediada por el factor NF- $\kappa$ B, tal y como ha sido descrito con anterioridad (Gewirtz et al., 2000). Además, vemos en nuestros datos que también se producen otro tipo de moléculas proinflamatorias como son las quimiocinas, familias CCL y CXC (CCL20 y CCR7 son quimioquinas involucradas en la activación de la respuesta inmune innata (Ferrero et al., 2012; Segat et al., 2010)), y proteínas antimicrobianas de la familia S100. Todos estos datos describen un proceso claro de infección tal y como está descrito en trabajos anteriores similares (Arce et al., 2010; Eckmann and Kagnoff, 2001). Otras moléculas sobreexpresadas como DDX60, IFI44 e IFIH1 desempeñan un papel importante en la amplificación de la respuesta inmune innata a través del reconocimiento de los metabolitos de ARN que se producen durante la infección (Nejentsev et al., 2009). LCN2 está involucrado en la inmunidad innata; limita la proliferación bacteriana al secuestrar hierro unido a sideróforos microbianos, como la enterobactina (Shields-Cutler et al., 2016). MMP7 está involucrada en la regulación de la actividad de las defensinas en la mucosa intestinal (Salzman, 2010). MX1 participa en la respuesta inmune frente a virus (Haller et al., 2007). UBD promueve la expresión de la subunidad beta 9 del proteasoma (PSMB9) y regula la activación mediada por TNF-alfa y mediada por LPS del mediador central de la inmunidad innata NF- $\kappa$ B (Theng et al., 2014).

Tras obtener estos datos que definen un proceso de infección bacteriano común, lo lógico sería que una vez que las células son infectadas por las bacterias, la respuesta inmune que se produce concluya en muerte celular, frenando de este modo el proceso de infección (Paesold et al., 2002). Sin embargo, ocurre lo contrario. Tras un tiempo de incubación de 24 horas con *Salmonella*, las células siguen vivas y albergan en su interior aparentes nichos de replicación. Este suceso solo puede explicarse a través de la teoría de que *Salmonella* es capaz de modular la respuesta celular para su

propia supervivencia, como está descrito que ocurre en macrófagos (Alpuche-Aranda et al., 1994; Helaine et al., 2014; Masud et al., 2019; Monack et al., 2004). Para ver cómo puede estar relacionada esta teoría con nuestros resultados, se analizaron los datos de expresión génica de la bacteria. En el epicentro de esta posible modulación bacteriana se encuentran los sistemas de secreción de tipo III, T3SS1 y T3SS2, que están codificados en las SPI-1 y SPI-2. Al igual que muchos otros patógenos bacterianos gram-negativos, *Salmonella* usa estos sistemas, cuya estructura es similar a una jeringa, para secretar o inyectar distintas moléculas dentro de la célula, mientras evita la exposición al medio extracelular. Los dos T3SS en *Salmonella* se expresan de manera transitoria en momentos específicos durante la patogénesis y tienen funciones distintas. T3SS1 secreta efectores que median la invasión de células no fagocíticas y la formación inicial del SCV, mientras que T3SS2 media el mantenimiento de la SCV (LaRock et al., 2015). Por lo tanto, la expresión de T3SS1 y T3SS2 es secuencial, ya que los genes SPI-1 se expresan antes, 1 o 2 horas tras la internalización, y durante la invasión, mientras que los genes SPI-2 aumentan su expresión con el tiempo, después de la internalización en la célula y de acuerdo con la maduración de la SCV (Hansen-Wester and Hensel, 2001; Hautefort et al., 2008; Kroger et al., 2013). En resumen, en nuestros datos encontramos sobreexpresados un grupo de genes pertenecientes a la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) que están directamente relacionados con el proceso inicial de invasión, y otro grupo perteneciente a la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) directamente relacionados con la estabilización del fagosoma.

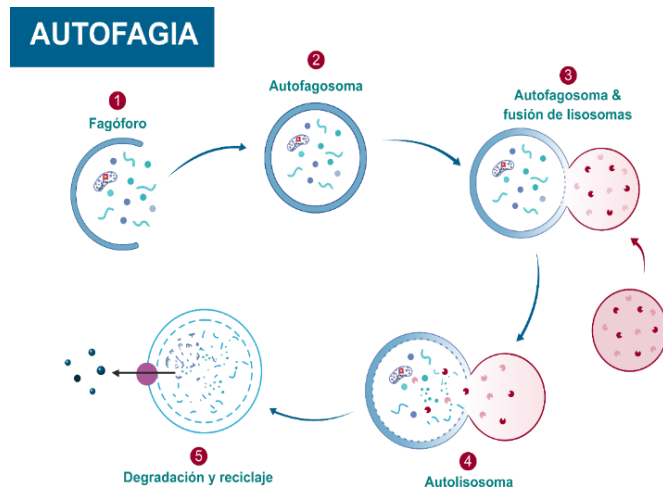
Viendo los resultados desde una perspectiva conjunta, del total de genes diferencialmente expresados del hospedador, que estén relacionados con rutas metabólicas que permitan la formación de una vesícula como nicho de replicación, solo encontramos los pertenecientes a la ruta de la

autofagia. Además, algunos de estos genes parecen estar descritos como potenciales dianas de distintos efectores secretados por *Salmonella* (Yu et al., 2014). Inicialmente, la autofagia, se describió como un proceso no específico inducido en condiciones de inanición para reciclar distintos componentes celulares para compensar la falta de nutrientes y, por lo tanto, se denominó autofagia no selectiva. Más tarde, se ha demostrado que la autofagia puede inducirse en células sin falta de nutrientes para degradar sustratos específicos, como proteínas agregadas, mitocondrias dañadas o patógenos (como bacterias y virus), lo que se conoce como autofagia selectiva (Nguyen et al., 2019). Nuestros datos indican alteraciones en la expresión de genes involucrados en distintos puntos del proceso de autofagia. La ruta de la autofagia puede describirse mediante 5 puntos principales denominados como formación de la membrana, iniciación del fagóforo, formación del autofagosoma, fusión con lisosoma y, finalmente, el paso de la degradación (**Figura 20 A**).

Los complejos principales de la ruta de la autofagia pueden agruparse en cinco complejos funcionales. Estos complejos son el complejo de proteína quinasa ULK, formado por las proteínas ULK, ATG13, ATG101 y FIP200; el complejo de fosfoinositida 3-quinasa de clase III (PI3K), formado por las moléculas VPS34, VPS15, Beclin 1 y ATG14. Además, la molécula de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) se une al tercer complejo formado por ATG2A, ATG2B y WIPI1-4. Finalmente, los dos sistemas restantes son de tipo ubiquitina (UBL) donde participan las moléculas ATG3, ATG4, ATG5, ATG7, ATG8, ATG10, ATG12 y ATG16L1 actuando en conjunto entre ellas mediante marcajes con fosfatidiletanolamina (PE) permitiendo el anclaje de moléculas de LC3-II en la membrana. Finalmente, la molécula ATG9 está definida como la única proteína integral de membrana esencial para la autofagia (**Figura 20 B**).



A



B

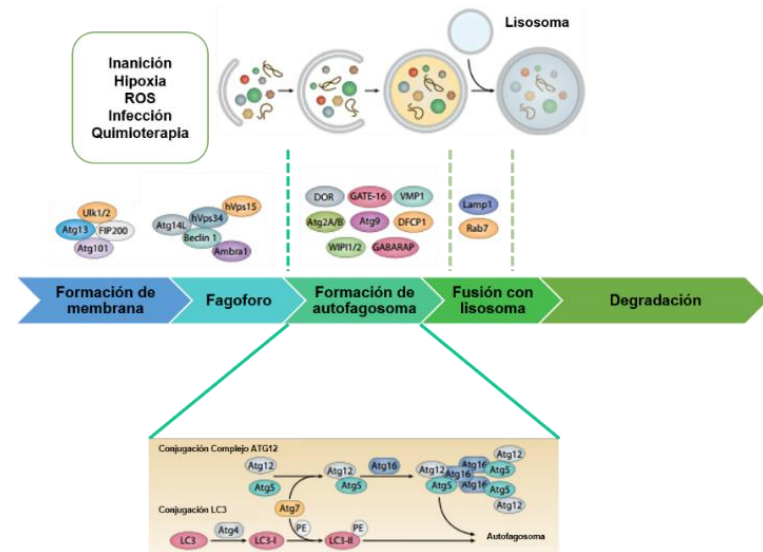


Figura 20. Esquema de los principales pasos de la ruta de autofagia. (A) (imagen obtenida de la web Biorender). (B) Principales moléculas implicadas en el proceso de autofagia (imagen adaptada de (web-www.ibric.org, 2019)).

En nuestros datos observamos que la línea epitelial intestinal IPI-21 sobreexpresó los genes ATG9B, ATG16L2 y ATG18, mientras que el gen ULK4 se vio reprimido por la infección (**Tabla 6**). Todos estos genes están involucrados en distintos puntos del proceso de autofagia. Los genes de la familia ATG están involucrados en el mantenimiento y aumento de tamaño del fagosoma, mientras que las proteínas ULK están relacionadas con el complejo iniciador que permite el comienzo de formación de la membrana del fagóforo. En un proceso de infección, la bacteria comienza por inyectar efectores en la célula atravesando la membrana plasmática mediante el sistema de secreción tipo 3 (T3SS1, SPI-1), favoreciendo la formación de poros. A través de estos poros, la célula pierde componentes esenciales del citoplasma como son los aminoácidos, entre otras, creando un falso estado de inanición en la célula. Este estado activa el proceso de autofagia, lo cual aprovecha la bacteria durante su proceso de invasión (Casanova, 2017; Kreibich et al., 2015). Este proceso no dura mucho tiempo ya que una vez iniciado el proceso de invasión bacteriana la SPI-1 se mantiene activa de 1 a 3 horas, para continuar, posteriormente, con la expresión de la SPI-2 y cuyos efectores están implicados en estabilizar el fagosoma y la SCV (Casanova, 2017). Por tanto, a modo de resumen, intuimos que el proceso de formación de la SCV comienza con una primera fase, definida por la actividad de SPI-1, seguida de una segunda fase de reparación de la membrana (modulación genes autofagia) y expresión de SPI-2 que estabilice dicha vesícula como nicho de replicación (**Figura 21**).

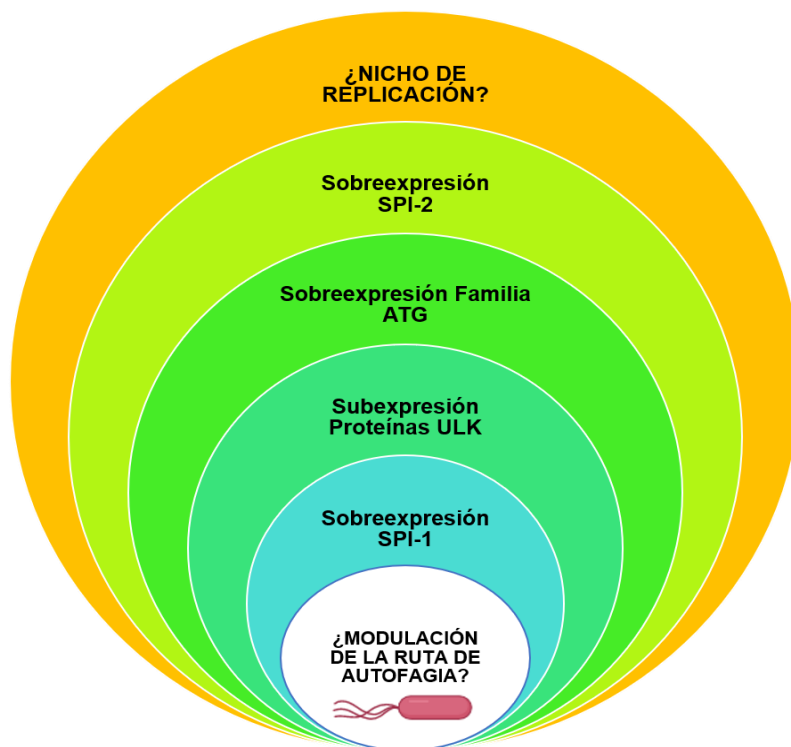


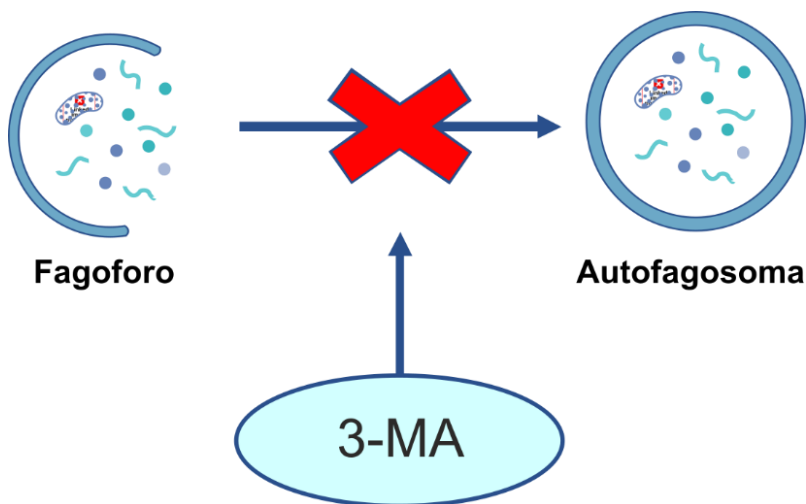
Figura 21. Diagrama de los datos transcriptómicos que resumen la hipótesis de la posible modulación de ruta de autofagia.

Está descrito que el sellado de la membrana de la SCV necesita reguladores (el principal es mTOR), factores de reclutamiento como galectinas y optineurina, y factores de iniciación (proteínas **ULK**, PI3-K C3, Beclin1, proteínas VPS, **ATG9**), así como otras proteínas encargadas del mantenimiento (ATG2, ATG3, ATG4, ATG5, ATG12, **ATG16L1**, **ATG18**) entre otras (**Figura 20 B**). El reclutamiento de la molécula LC3 ocurre a través de varias vías. Una de ellas depende de la regulación positiva de algunos genes de la ruta de autofagia como *ATG16*, *ATG12*, *ATG5* y *ATG9*, entre otros, o por otro lado, puede ocurrir a través de otros procesos como la presencia de ROS y el proceso de fagocitosis asociado a LC3 (LAP),

entre otros (Huang et al., 2009; Shahnazari et al., 2010). Según nuestros datos, la reparación de la SCV es dependiente de la ruta de autofagia necesitando la presencia de los genes ATG, lo que sugiere también, que la molécula LC3 se recluta debido a la actividad mediada por la SCV dañada, la cual modula la actividad de los genes de la ruta de la autofagia para repararse, descartando de esta forma otras vías de reclutamiento como LAP o la presencia de ROS (**Figura 20 B**).

Por tanto, ¿sería posible que *Salmonella* utilice los componentes de esta ruta metabólica de la autofagia en su propio beneficio para mantener estable la vesícula que le permite replicarse en el interior celular? Para resolver esta pregunta decidimos inhibir la ruta de la autofagia mediante el uso de un inhibidor denominado 3-Metiladenina. Dicho inhibidor actúa impidiendo que se forme el autofagosoma (**Figura 22**). Nuestros resultados indican que siempre vemos menos bacteria tras la infección en presencia del inhibidor. Es posible que una alteración en la regulación de la vía de la autofagia obstaculice la formación y el mantenimiento de la SCV en las células, limitando de esta forma la replicación de la bacteria. Es importante destacar que el punto de mayor actividad autofágica ocurre durante las primeras 2 horas en un proceso de infección que, curiosamente, corresponde con la regulación negativa de la expresión de T3SS1 y la regulación positiva de T3SS2. Asumimos que la baja regulación de T3SS1 permite la restauración de la integridad de la membrana y la inducción de T3SS2 provoca una inhibición parcial de la autofagia (complejos iniciadores) para focalizarse en el mantenimiento de la SCV (Tattoli et al., 2012). De ser esto posible, la siguiente pregunta sería ¿qué ocurriría si los componentes de la autofagia que permiten la reparación y el mantenimiento de la SCV no estuvieran disponibles? Se ha descrito que uno de los factores principales que permiten el cambio de expresión en la bacteria para comenzar a

producir efectores del T3SS2 es la acidificación del compartimento donde se aísla tras la entrada en la célula (Kreibich et al., 2015).



*Figura 22. Esquema que indica el punto de la ruta que bloquea el inhibidor 3-MA.*

Con el uso de 3-MA estamos provocando exactamente este hecho. No permitimos que dichos componentes estén disponibles ya que la ruta está bloqueada. De esta forma la membrana inicial no puede repararse ni mantenerse, impidiendo de esta forma que se acidifique el interior de la SCV y, por tanto, queda la bacteria expuesta a los componentes del citosol, entre los que se encuentran las ubiquitinas que la marcarían para una futura degradación. Por tanto, es lógico que obtuviéramos una menor carga bacteriana en las células tratadas con 3-MA (**Figura 23**).



En nuestros resultados vimos que el LC3 parece acumularse en las células tratadas con 3-MA. Esta acumulación coincide con la mostrada por otros autores (Ni et al., 2010; Wu et al., 2010). En la situación de las células control IPI-2I infectadas con *Salmonella* vemos menos marcaje de LC3 porque la ruta de autofagia es funcional y la molécula está en continuo uso, por lo que no debe acumularse. Sin embargo, en la situación de células infectadas y tratadas con 3-MA la ruta de autofagia está bloqueada justo en el paso anterior a la participación de LC3. Por tanto, al no completarse el cierre de las vesículas la molécula LC3 se va acumulando, y por eso vemos una mayor cantidad de esta molécula (**Figura 23**). Este hallazgo revela que la autofagia es esencial dentro del proceso de infección de las células epiteliales intestinales por *Salmonella*. Es necesario realizar estudios adicionales que confirmen la interacción de los factores de virulencia de *Salmonella* con el proceso de autofagia.

Está descrito que la bacteria necesita expresar los genes de la SPI-1 para sobrevivir a las condiciones del sistema digestivo, concretamente el íleon, el cual es el punto donde se concentra el foco de la infección (Hansen-Wester and Hensel, 2001), mientras que la expresión de los genes de la SPI-2 se produce una vez que la bacteria ha invadido las células epiteliales y se encuentra bajo unas condiciones concretas que comienzan a darse en los compartimentos endosoma-fagosoma (Figueira and Holden, 2012). De los factores de virulencia obtenidos en el set de datos de *Salmonella* hay algunos directamente relacionados con genes diana del proceso de autofagia. Entre ellos destacamos la familia SOP que actúan sobre varias proteínas RAB y CDC42, destacando sopB, sopD2, sopE y sopE2 (Schroeder et al., 2010; Teo et al., 2017). También es importante la familia SSE (sseB, sseC, sseD, sseF, sseG, sseJ, sseL y sseL) que actúa sobre proteínas RAB y sobre los genes de la familia ATG (Feng et al., 2018; Mesquita et al., 2012). También sobre las proteínas RAB actúa la familia de

proteínas bacterianas SIF (sifA y sifB) (Brumell et al., 2002). Las proteínas SIP parecen tener doble función: por un lado, son importantes ya que actúan directamente sobre la actina remodelando la estructura del citoesqueleto (sipA y sipC), pero también promueven la replicación bacteriana (sipC) (Chubiz et al., 2010; Stein et al., 1996). La familia SSA (ssaD, ssaG, ssaI, ssaJ, ssaL, ssaM, ssaS, ssaT, ssaU y ssaV) interfiere con el tráfico vesicular impidiendo la fusión de la SCV con los lisosomas (Hensel et al., 1997; Hensel et al., 1998; Ochman et al., 1996; Uchiya et al., 1999).

Sería de gran interés en el futuro el estudio de mutantes relacionados con los distintos procesos de formación y mantenimiento de la SCV. De esta forma podríamos determinar una posible diana terapéutica para el tratamiento de *Salmonella*, la cual afectaría directamente a los efectores relacionados con la formación y mantenimiento del SCV, lo que retrasaría o impediría la replicación bacteriana dentro del hospedador. Este hecho podría significar una respuesta inmune mucho más eficaz del hospedador y por lo tanto un tratamiento eficaz contra *Salmonella*.



# **Capítulo 4**

**Estudio transcriptómico de nódulos  
linfáticos mesentéricos porcinos en la  
infección con *Salmonella* Typhimurium**



## Resultados

Como hemos visto en el Capítulo 1, a 2 días post-infección, la infección por *Salmonella* Typhimurium se caracteriza por colonizar el sistema digestivo, incidiendo mayoritariamente en la mucosa de íleon, llegando hasta los órganos linfoides, como las tonsilas y los nódulos linfáticos mesentéricos. Sin embargo, a 30 días post-infección el sistema digestivo está totalmente recuperado y la bacteria se observa en la zona trabecular de los nódulos linfáticos. Por este motivo, decidimos analizar mediante transcriptómica los cambios que ocurren en el tejido linfoide en esos dos puntos de estudio, de manera que podamos entender cómo la bacteria es capaz de modular la respuesta inmune del hospedador durante la etapa de infección aguda (2 d.p.i.) así como los posibles mecanismos para permanecer en este tejido a tiempos largos (30 d.p.i.).

Para este estudio se seleccionaron y procesaron muestras de la infección experimental *in vivo* previamente descrita en Material y Métodos, obtenidas a partir de nódulos linfáticos mesentéricos tras 2 días (2 d.p.i.) y 30 días (30 d.p.i.) de infección con *Salmonella* Typhimurium. Dos muestras de cada tiempo de estudio (una muestra por cerdo) fueron elegidas para la extracción de ARN, en total 6 muestras de ARN (2 de 0 d.p.i., 2 de 2 d.p.i. y 2 de 30 d.p.i.). Como control de calidad de la cantidad e integridad del ARN se realizaron cuantificaciones en Nanodrop 1000 (Thermo Fisher), visualización en gel de agarosa y análisis con Bioanalyzer 2100 (Agilent). Los valores de integridad del ARN (RIN) fueron todos superiores a 7, indicando su aptitud para secuenciación. Las muestras fueron enviadas a secuenciar en el Instituto de investigación Biomédica de Barcelona (IRB Barcelona) y analizadas en el centro de supercomputación y bioinnovación de la Universidad de Málaga (SCBI-UMA).

En la secuenciación se obtuvieron una media de 70.061.500 lecturas por muestra, quedando después de la limpieza y preprocesamiento una media de 52.524.509 lecturas para analizar. De esas lecturas, el 34,2 % mapeaba con el transcriptoma porcino (**Tabla 1**).

*Tabla 1. Resultados de secuenciación de ARN de NLM control e infectados con S. Typhimurium a 2 d.p.i y 30 d.p.i. % mapeo: % de lecturas limpias que mapeaban al transcriptoma porcino.*

| Situación | Tiempo    | Muestra  | Lecturas   | Lecturas tras filtro | % mapeadas transcriptoma porcino |
|-----------|-----------|----------|------------|----------------------|----------------------------------|
| NLM       | 0 d.p.i.  | C0A-NLM  | 76.672.182 | 52.398.444           | 30,86                            |
|           |           | C0B-NLM  | 71.732.503 | 49.503.618           | 31,29                            |
|           | 2 d.p.i.  | C2A-NLM  | 75.489.092 | 57.394.331           | 39,51                            |
|           |           | C2B-NLM  | 92.803.590 | 70.090.181           | 33,13                            |
|           | 30 d.p.i. | C30C-NLM | 94.086.614 | 70.805.348           | 34,92                            |
|           |           | C30D-NLM | 86.257.203 | 67.353.578           | 35,93                            |

## 1. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE NLM INFECTADOS CON S. TYPHIMURIUM A 2 D.P.I.

En el análisis de los datos de secuenciación se obtuvieron 910 transcritos que se expresaron de manera diferencial entre el control y los NLMs infectados con *Salmonella* a 2 d.p.i., de los cuales 673 estaban sobreexpresados (73,95 %) y 237 subexpresados (26,05 %). De ellos, 764 transcritos (pertenecientes a 558 genes diferentes) estaban anotados en el genoma porcino (**Archivo Suplementario 4**).

Entre los transcritos con mayor nivel de expresión (**Tabla 2**) se encuentra *SAA1* que codifica para la proteína amiloide sérica A1, una proteína de fase aguda expresada en situaciones de inflamación. Otros genes son indicadores de la fuerte respuesta inflamatoria que tiene lugar en el tejido infectado. Entre ellos tres miembros de la familia génica S100 (*S100A8*, *S100A9* y *S100A12*), codificantes de proteínas de unión a calcio de bajo peso molecular que funcionan como mediadoras de la respuesta inflamatoria y poseen actividad antimicrobiana; los transcritos de respuesta antimicrobiana *LTF* (lactotransferrina) y *DEFB1* (defensina  $\beta 1$ ), expresados en las células del sistema inmune innato; el gen *RETN* que codifica para la resistina, una proteína expresada por los macrófagos que participa en la respuesta inmune incrementando la expresión de muchas citoquinas proinflamatorias; y los genes *CXCL10*, *CXCL9*, *CXCL11*, *CCRL2* y *CXCL8*, codificantes de quimioquinas con una función relevante en la promoción de la comunicación, la adhesión y la maduración de las células del sistema inmune innato. Muchos genes son representativos de la interacción entre la respuesta inmune innata y la adquirida, principalmente el gen *TREM1* que codifica para un receptor de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresado tanto en macrófagos como en neutrófilos y el gen interferón  $\gamma$  (*IFNG*) con función relevante en la presentación antigénica y en la respuesta celular mediada por células T.

Tabla 2. Top 40 genes diferencialmente expresados en NLM tras la infección con *S. Typhimurium* (2 d.p.i.). Log<sub>2</sub>FC: logaritmo del valor de cambio; genes seleccionados con FDR (Valor de *p* corregido) <0,001; rojo: sobreexpresión; verde: subexpresión.

| Genes        | Ensembl transcrito (cerdo) | log <sub>2</sub> FC |
|--------------|----------------------------|---------------------|
| ADGR1-EMR1   | ENSSSCT00000027062         | 3,23                |
| ANKRD22      | ENSSSCT00000011430         | 3,46                |
| BATF2        | ENSSSCT00000025376         | 3,03                |
| C4BPA        | ENSSSCT00000030292         | 2,41                |
| CCRL2        | ENSSSCT00000030552         | 2,57                |
| CFAP161      | ENSSSCT00000002001         | 3,12                |
| COL11A1      | ENSSSCT00000007510         | -3,74               |
| CXCL10       | ENSSSCT00000034392         | 3,84                |
| CXCL11       | ENSSSCT00000009833         | 2,66                |
| CXCL8        | ENSSSCT00000009807         | 2,39                |
| CXCL9        | ENSSSCT00000023437         | 3,21                |
| DEFB1        | ENSSSCT00000031972         | 2,57                |
| FAM26F       | ENSSSCT00000026294         | 3,01                |
| FAM26F       | ENSSSCT00000004909         | 2,89                |
| FNDC1        | ENSSSCT00000004480         | -2,81               |
| HK3          | ENSSSCT00000033900         | 2,42                |
| HK3          | ENSSSCT00000036248         | 2,36                |
| IDO1         | ENSSSCT00000007675         | 2,47                |
| IFNG         | ENSSSCT00000000519         | 2,69                |
| IGLV-4       | ENSSSCT00000033546         | 2,87                |
| KCNJ15       | ENSSSCT00000013198         | 2,38                |
| LILRB3       | ENSSSCT00000022375         | 2,59                |
| LOC100524999 | ENSSSCT00000010119         | 2,60                |
| LTF          | ENSSSCT00000030564         | 4,90                |
| NEURL3       | ENSSSCT00000008900         | 2,94                |
| NRAMP1       | ENSSSCT00000022794         | 3,62                |
| NRAMP1       | ENSSSCT00000023016         | 3,05                |
| PADI4        | ENSSSCT00000003869         | 3,13                |
| PSTPIP2      | ENSSSCT00000004968         | 2,67                |
| QPCT         | ENSSSCT00000028025         | 2,90                |
| RETN         | ENSSSCT00000014827         | 3,19                |
| RXFP1        | ENSSSCT00000009716         | 4,31                |
| S100A12      | ENSSSCT00000007218         | 4,37                |
| S100A8       | ENSSSCT00000007219         | 4,85                |
| S100A9       | ENSSSCT00000033945         | 3,93                |
| SAA1         | ENSSSCT00000014602         | 4,78                |
| TFEC         | ENSSSCT00000018115         | 2,39                |
| TGM1         | ENSSSCT00000002231         | 2,42                |
| TREM1        | ENSSSCT00000035016         | 2,42                |
| WARS         | ENSSSCT00000002794         | 2,54                |

El estudio de los datos transcriptómicos en el contexto de ontología génica fue llevado a cabo mediante IPA con el fin de adscribir funciones y rutas biológicas al set de genes diferencialmente expresados tras la infección con *Salmonella* (**Archivo suplementario 4**). Las funciones biológicas enriquecidas de mayor nivel de significación, es decir, las funciones biológicas que resultaron alteradas por la expresión diferencial de genes (**Figura 1**) estaban mayoritariamente relacionadas con la respuesta inflamatoria y antimicrobiana, el reclutamiento y transporte de células inmunes, el desarrollo del tejido linfoide, la muerte celular y la interacción célula-célula.

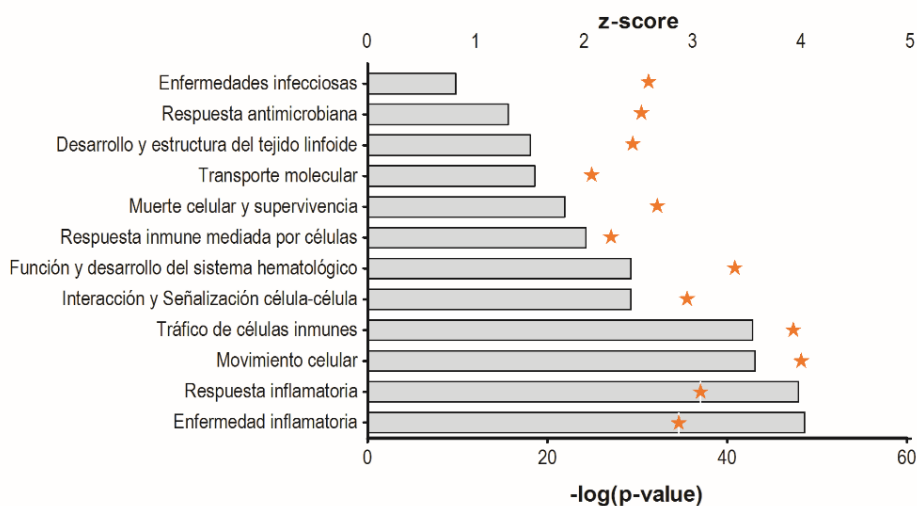


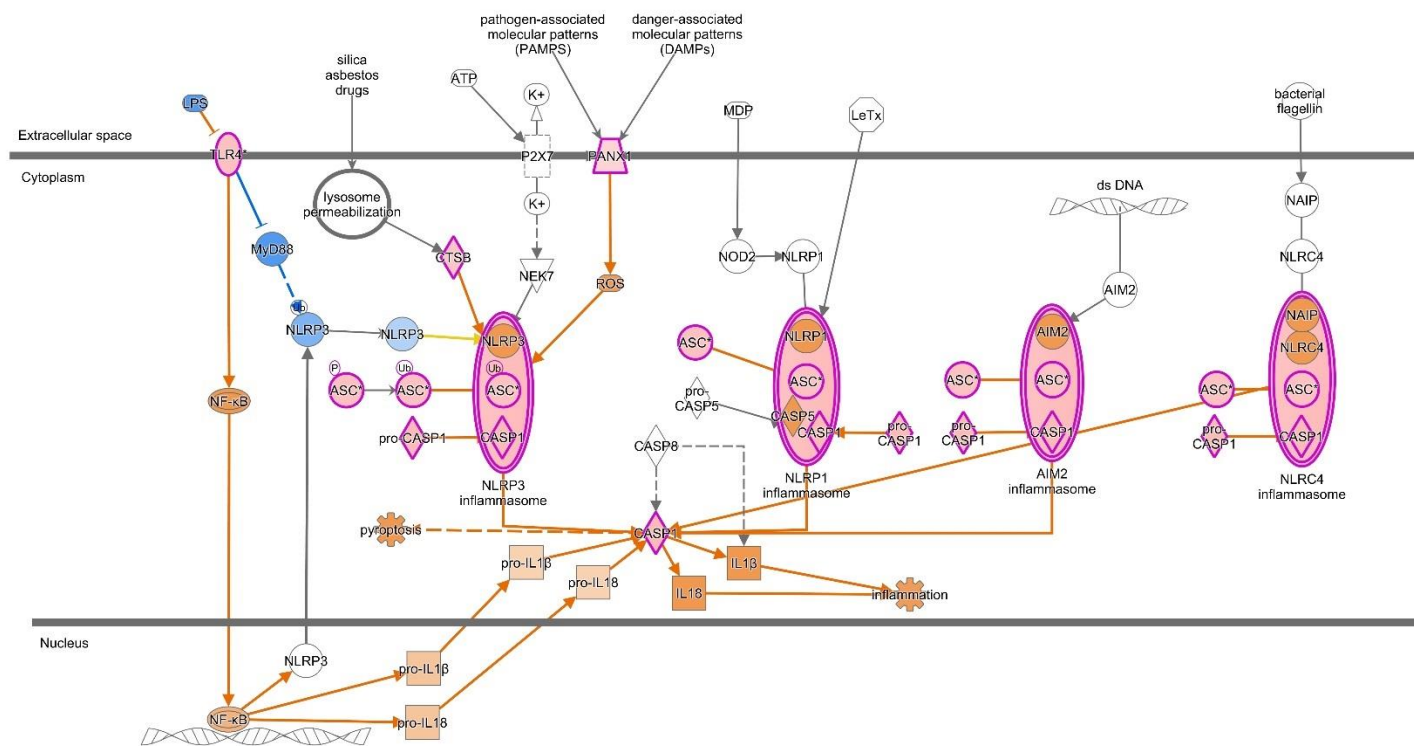
Figura 1. Funciones biológicas alteradas por la expresión diferencial de genes en NLM a 2 d.p.i., representadas por el valor p (barras) y el valor z (z-score, estrellas naranjas), el cual predice activación si es positivo, y es significativo si es  $> 2$  ó  $< -2$ .

A diferencia del estudio de funciones biológicas (**Archivo suplementario 4**), el análisis de rutas canónicas mediante IPA permitió predecir la activación de una determinada ruta de señalización. Las rutas canónicas de mayor nivel de enriquecimiento se muestran en la **Tabla 3**. De nuevo, se observa la alteración de procesos biológicos relacionados con la activación de la respuesta inflamatoria, probablemente como consecuencia de la regulación de la ruta de señalización de los receptores TLRs (sobreexpresión de genes como *TLR2*, *TLR4*, *TLR8*, *CD14*) y la activación del inflamasoma (sobreexpresión de *TLR4*, *NOD1*, *CASP1* y *IL18* contribuyendo por un lado a la respuesta innata en estadios tempranos de infección y, por otro a la aparición de procesos de muerte celular (**Figura 2**). En efecto, la infección regula genes implicados en la muerte celular programada como *BNIP5*, *CIDEB*, *CD274* ó *BCL2L14* que podrían ser indicadores de la existencia de procesos de apoptosis. Sin embargo, la sobreexpresión de *PYCARD*, *IFNG*, *TNF*, *CASP1* apuntan hacia la conformación del ACS-piroptosoma, responsable de un tipo específico de respuesta inflamatoria propio de los macrófagos y dependiente de muerte celular por piroptosis.



Tabla 3. Rutas de señalización afectadas por la expresión diferencial de genes en NLM a 2 d.p.i. Rutas seleccionadas con valor de  $p < 0,05$ .

| Rutas de señalización   | Z-score | Genes  |
|---|---------|--|
| Activación de IRF mediante receptores de reconocimiento de patrones citosólicos | 2,4     | CD40,IFIT2,IL10,IRF7,STAT1,TNF   |
| Señalización de respuesta de fase aguda   | 1,1     | C1R,C4BPA,CEBPB,CRP,FTL,IL1RAP,ITIH3,RBP5,SAA1,SERPING1,SOCS1,SOD2,TNF             |
| Ruta de presentación de antígenos   |         | B2M,IFNG,PSMB9,TAP1,TAP2   |
| Comunicación entre las células de la respuesta inmune innata y adaptativa       |         | B2M,CD40,CD40LG,CXCL10,CXCL8,FCER1G,IFNG,IL10,IL15,TLR2,TLR4,TLR8,TNF,TNF SF13B    |
| Sistema del complemento   | -0,4    | C1QA,C1QB,C1R,C3AR1,C4BPA,CFH,CFI,SERPING1   |
| Señalización CXCR4  | 1       | ADCY2,ATP,CXCL12,EGR1,GNG10,PAK1   |
| Maduración de células dendríticas   | 1,7     | B2M,CD40,CD40LG,COL10A1,FCER1G,FCGR2B,ICAM1,IL10,IL15,STAT1,TLR2,TLR4,TNF, TYROBP  |
| Señalización IL10   |         | ARG2,BLVRA,CCR1,CCR5,CD14,FCGR2B,IL10,IL1RAP,TNF                                   |
| Señalización y producción de IL12 en macrófagos                                 |         | CD40,CD40LG,CEBPB,IFNG,IL10,IRF1,LYZ,S100A8,STAT1,TLR2,TLR4,TNF                    |
| Señalización IL6  | 0,8     | CD14,CEBPB,CRP,CXCL8,IL1RAP,SOCS1,TNF  |
| Señalización IL8  | 1,9     | CSTB,CXCL8,CYBB,FLT4,GNG10,ICAM1,NOX4,PTGS2  |
| Ruta del inflammasoma   | 2,4     | ATP,CASP1,CTSB,CXCL8,PANX1,TLR4  |
| Señalización interferón   | 1,9     | IFIT1,IFIT3,IFNG,IRF1,SOCS1,STAT1,TAP1   |
| Activación LXR/RXR  | -2,3    | ARG2,CCL2,CD14,IL1RAP,LY96,LYZ,NR1H3,PTGS2,S100A8,SAA1,TLR4,TNF                    |
| Regulación del MIF de la inmunidad innata                                       | 2,2     | CD14,LY96,PLA2G2D,PTGS2,TLR4   |
| Señalización NF- $\kappa$ B   | 2,3     | CD40,CD40LG,FCER1G,FLT4,TLR2,TLR4,TLR8,TNF,TNFSF13B                                |
| Formación del fagosoma  |         | CLEC7A,FCER1G,FCER2,FCGR2B,ITGA3,MARCO,MRC1,TLR2,TLR4,TLR8                         |
| Maduración del fagosoma   |         | ATP6V1B1,B2M,CTSA,CTSB,CTSH,CTSL,CTSS,CTSZ,CYBB,LAMP1,LAMP2,NOS1,NOX4 ,TAP1,TCIRG1 |
| Producción de óxido nítrico y ROS en macrófagos                                 | 3,4     | ARG2,CYBB,IFNG,IRF1,LYZ,NCF1,NCF4,S100A8,STAT1,TLR2,TLR4,TNF                       |
| Papel de los receptores de reconocimiento de patrones de bacterias y virus      | 2,3     | C1QA,C1QB,C3AR1,CASP1,CLEC7A,CXCL8,IFNG,IL10,IRF7,NOD1,TLR2,TLR4,TLR8,TNF          |
| Activación de rutas TH1 y TH2   |         | ACVR1B,CCR1,CCR5,CD274,CD40,CD40LG,ICAM1,IFNG,IL10,IRF1,SOCS1,STAT1                |
| Ruta de señalización TH1  |         | CCR5,CD274,CD40,CD40LG,ICAM1,IFNG,IL10,IRF1,SOCS1,STAT1                            |
| Señalización mediada por TLR  | 2,2     | CD14,LY96,TICAM2,TLR2,TLR4,TLR8,TNF,UBD  |



© 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 2. Ruta de señalización del inflammasoma en NLN a 2 d.p.i.

A 2 d.p.i., un gran número de genes sobreexpresados se encuentran regulados por *IFNG*. Entre ellos diversos genes de la familia IFIT (*interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats*) como *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFIT5* y *IFITM1* y genes que codifican para GTPasas reguladoras del inflammasoma (*GBP1* y *GBP2*). Algunos genes codificantes de factores de transcripción, con una función relevante en la ruta de señalización del Interferón  $\gamma$  como *IRF1*, *IRF7* y *STAT1* también resultaron sobreexpresados, así como otros genes inducidos por la expresión de *IFNG* como *CASP1*, *CD14*, *IL18*, *TNF* y *WARS*, en gran parte responsables de la intensa respuesta inflamatoria que tiene lugar en el NLM infectado. El elevado incremento de la expresión de *IFNG* (6,5 veces más que en controles no infectados) resulta un factor clave en la respuesta a *Salmonella*, al regular la activación (z-score >2) no sólo de rutas canónicas relacionadas con la respuesta inmune innata sino también de otras relacionadas con la respuesta adaptativa, principalmente aquellas implicadas en la presentación antigénica, la respuesta *Th1* y *Th2* y la señalización mediada por IL12 (**Tabla 3**). Así, resulta activado el eje CXCL9, -10, -11/CXCR2, que participa en la migración y reclutamiento de células innatas, pero también en la polarización *Th1* en respuesta a IFN- $\gamma$ . Por otro lado, la sobreexpresión de algunos genes como *PDCD1LG2*, *ADGRE1*, *ADGR5* y *MRC1* está relacionada con la proliferación de las células T y la activación de la función de macrófagos y células dendríticas. La regulación de genes de MHC de clase II (*SLA-DRB1*, *-DMB*, *-DRA*, *-DQB1*, *-DQA*) es un indicador claro de la existencia de respuesta celular Th dependiente en el tejido infectado.

La maduración del fagosoma es una de las rutas canónicas significativamente enriquecidas en la infección por *Salmonella* a 2 d.p.i. (**Tabla 3**) y está relacionada con la presentación antigénica y la activación de la respuesta inmune celular. Diferentes genes indicadores de la actividad lisosomal están sobreexpresados en el NLM a 2 d.p.i. Entre ellos *LAMP1* y *LAMP2* codificantes de proteínas estructurales de membrana, y los genes *CTS*, *LYZ* y *ACP2* codificantes de proteasas y fosfatasa lisosomales implicadas en el catabolismo de proteínas dentro de los compartimentos endocíticos. La existencia de una intensa actividad lisosomal en el tejido infectado es también puesta de manifiesto a través de la regulación de un elevado número de genes codificantes de proteínas especializadas en el transporte de moléculas (SLC). Entre ellos se encuentra *SLC15A3*, que es un mediador de la salida de péptidos bacterianos desde el endolisosoma hasta el citosol en macrófagos y células dendríticas. Además, e íntimamente ligado al procesamiento de antígenos que se internalizan vía fagosomas, la infección con *Salmonella* determina también la activación del proteasoma al resultar regulados genes como *TAP1*, *TAP2*, *PSMB9* y *PSME2* y otros como *NEURL3*, *UBD* y *UBEL6* que están implicados en la ubiquitinación de péptidos citosólicos. Estos resultados, junto a la sobreexpresión de genes de MHC de clase I (*SLA-5*, *SLA-8*) podrían ser indicadores de la existencia de presentación cruzada (*crosspresentation*) en NLM como consecuencia de la infección con *Salmonella* (**Figura 3**).

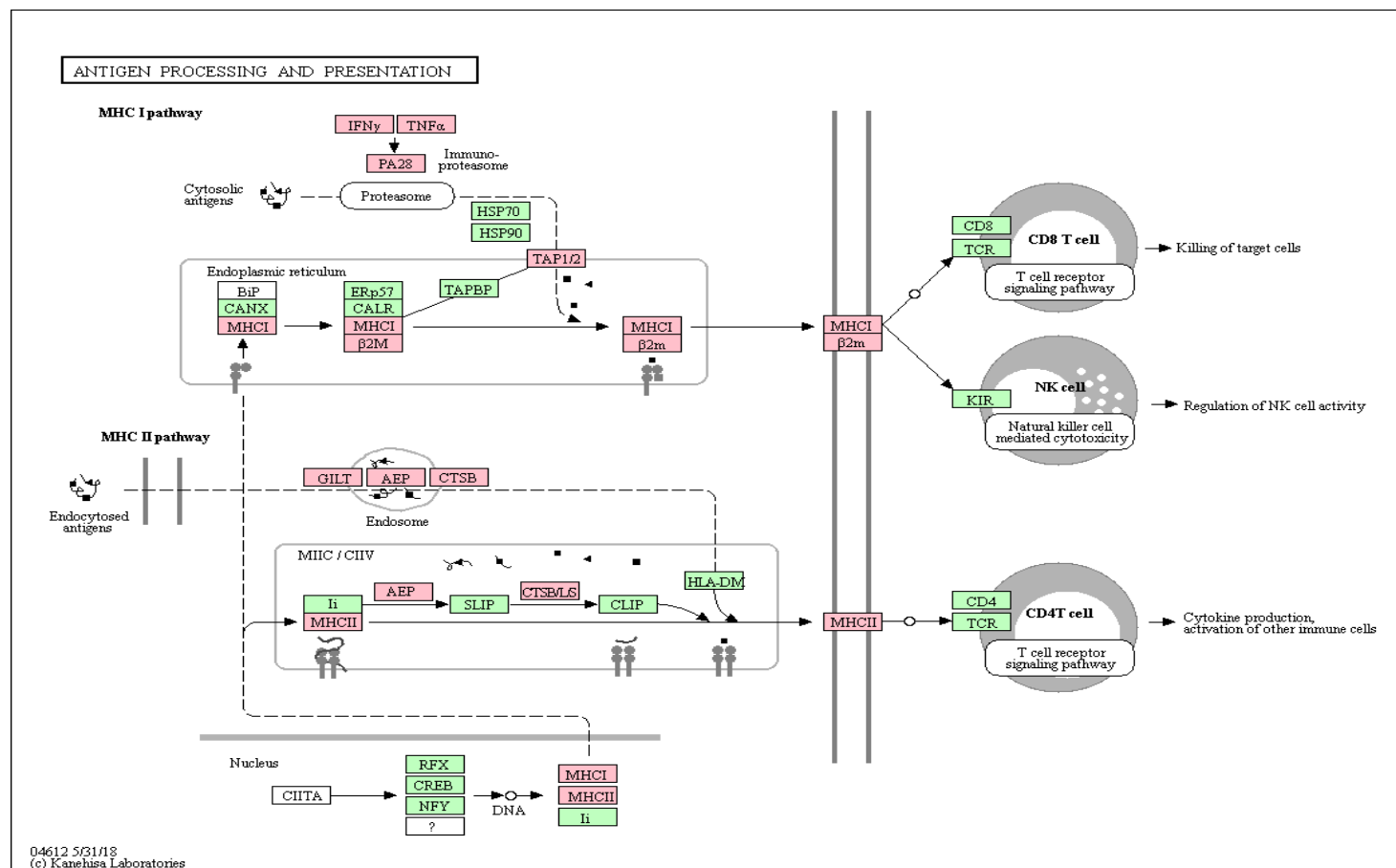


Figura 3. Ruta de procesamiento y presentación antigénica de KEGG. Rojo: genes diferencialmente expresados en nuestro estudio.

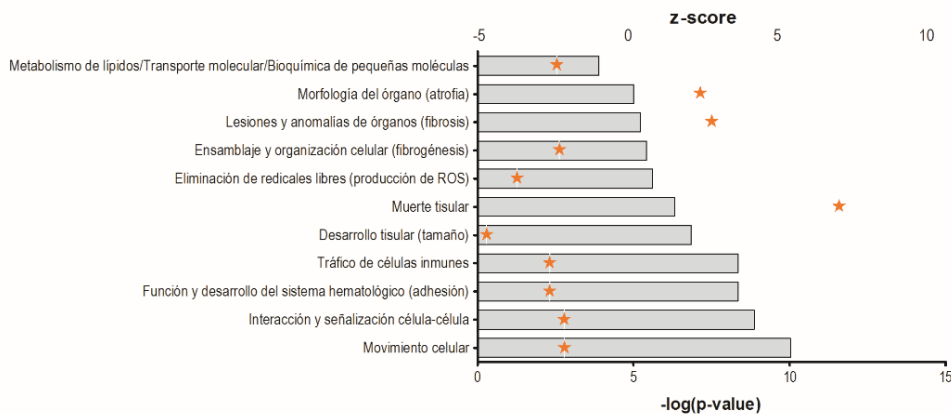
## 2. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LAS MUESTRAS DE NLM INFECTADOS CON *SALMONELLA* TYPHIMURIUM A 30 D.P.I.

En NLM 30 d.p.i. se obtuvieron 454 transcritos diferencialmente expresados que codificaban 298 genes (**Archivo suplementario 5**), de los cuales 67 genes se encontraron sobreexpresados (22,5%) y 231 genes subexpresados (77,5%). Los 40 genes con mayor valor de cambio se muestran en la **Tabla 4**. Entre ellos, los de mayor nivel de subexpresión son codificantes de proteínas de la matriz extracelular como *ELN*, *TNC*, *TNXB*, *DPT*, *COL2A1*, *COL5A1*, y *COL1A2*, y algunos que codifican para proteínas mediadoras de la unión entre células y de éstas con la matriz extracelular como *ADAMTS4*, *VCAN* y *THBS2*. Altamente subexpresados también se observan genes con una función relevante en la respuesta inflamatoria como *CXCL8*, *CCL20*, *IL1A*, *IL1R2* y *MAP1B* y otros que participan en la respuesta inmune celular como el gen *GZMA* codificante de una serinproteasa específica de linfocitos T citotóxicos y células NK, *LOC100622710* que codifica un receptor leucocitario tipo inmunoglobulina que participa en la presentación antigénica MHC de clase I, y el gen *MS4A7* asociado a la maduración de células de linaje mielóide. Un número menor de genes en la **Tabla 4** resultaron sobreexpresados a 30 d.p.i., entre los cuales *CLEC4G* codifica para una lectina de tipo C con función relevante en la respuesta mediada por células T.

Tabla 4. Top 40 genes diferencialmente expresados en NLM tras la infección con *S. Typhimurium* (30 d.p.i.). Log<sub>2</sub>FC: logaritmo del valor de cambio; genes seleccionados con FDR (valor de p corregido) <0,001; rojo: sobreexpresión; verde: subexpresión.

| Genes        | Ensembl transcrito (cerdo) | Log <sub>2</sub> FC |
|--------------|----------------------------|---------------------|
| ACOD1        | ENSSSCT00000010382         | -1,89               |
| ADAMTS4      | ENSSSCT00000006968         | -2,57               |
| C1orf186     | ENSSSCT00000017034         | -1,86               |
| C1QTNF3      | ENSSSCT00000018316         | -1,94               |
| CACNA1I      | ENSSSCT00000000088         | -2,15               |
| CCL20        | ENSSSCT00000017699         | -1,87               |
| CLEC4G       | ENSSSCT00000036533         | 2,42                |
| COL1A2       | ENSSSCT00000024528         | -1,85               |
| COL2A1       | ENSSSCT00000031054         | -2,4                |
| COL5A1       | ENSSSCT00000006323         | -2,07               |
| CSF3R        | ENSSSCT00000026465         | -2,25               |
| CXCL8        | ENSSSCT00000009807         | -2,41               |
| DDO          | ENSSSCT00000004864         | 2                   |
| DPT          | ENSSSCT00000006902         | -3,05               |
| ELN          | ENSSSCT00000032354         | -3,28               |
| F2RL2        | ENSSSCT00000015390         | -2,08               |
| FAM196A      | ENSSSCT00000027143         | -1,98               |
| GFPT2        | ENSSSCT00000015305         | -1,89               |
| GZMA         | ENSSSCT00000018408         | -2,54               |
| HBB          | ENSSSCT00000036536         | 2,06                |
| HTRA3        | ENSSSCT00000009543         | -2,74               |
| IL1A         | ENSSSCT00000008863         | -1,93               |
| IL1R2        | ENSSSCT00000030337         | -1,92               |
| KCNS3        | ENSSSCT00000027898         | 1,88                |
| LOC100515788 | ENSSSCT00000016078         | 1,9                 |
| LOC100524679 | ENSSSCT00000028870         | 1,98                |
| LOC100622710 | ENSSSCT00000023496         | -2,35               |
| MAP1B        | ENSSSCT00000018484         | -1,96               |
| MEDAG        | ENSSSCT00000010225         | -2                  |
| MS4A7        | ENSSSCT00000014322         | -2,07               |
| NPW          | ENSSSCT00000008806         | 2,47                |
| OVGP1        | ENSSSCT00000007439         | 2,25                |
| PI16         | ENSSSCT00000001749         | -2,5                |
| RYR1         | ENSSSCT00000003285         | -2,29               |
| SUCNR1       | ENSSSCT00000026178         | 1,88                |
| THBS2        | ENSSSCT00000004436         | -2,1                |
| TNC          | ENSSSCT00000026819         | -3,06               |
| TNXB         | ENSSSCT00000034199         | -2,36               |
| VCAN         | ENSSSCT00000035607         | -2,68               |
| ZP3          | ENSSSCT00000008432         | 2,07                |

Las funciones biológicas que se espera que aumenten o disminuyan en NLM de acuerdo con los cambios de expresión génica tras la infección con *Salmonella* a 30 d.p.i. se identificaron utilizando el algoritmo de puntuación z de regulación IPA (**Figura 4, Archivo suplementario 5**).



*Figura 4. Funciones biológicas alteradas por la expresión diferencial de genes en NLM a 30 d.p.i., representadas por el valor p (barras) y el valor z (z-score, estrellas naranjas), el cual predice activación si es positivo e inhibición si es negativo, y es significativo si es >2.*

Procesos biológicos relacionados con la respuesta al patógeno aparecen significativamente desactivados, principalmente aquellos implicados con la respuesta inflamatoria como el tráfico de células inmunes, el movimiento y la señalización celular y la producción de ROS. Otras funciones inhibidas, como las relacionadas con el desarrollo y el ensamblaje celular podrían ser el reflejo de una regresión en la funcionalidad del órgano, en correspondencia con la subexpresión de abundantes genes de la matriz extracelular. De manera similar, algunas rutas canónicas como la vía PI3K/Akt y la señalización mediada por proteínas quinasa (MAPK),



relacionadas con la promoción del crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular también resultaron inhibidas a 30 d.p.i. (**Tabla 5**). Por el contrario, la activación de funciones enriquecidas en genes implicados en supervivencia celular, morfología y fibrosis apuntan hacia la puesta en marcha de mecanismos de regeneración tisular propios de situaciones posteriores a periodos de inflamación intensa.

Aunque la respuesta inflamatoria frente a la bacteria ha quedado reducida a una mínima expresión a 30 d.p.i., con rutas canónicas inflamatorias inhibidas como las vías de señalización mediadas por NF- $\kappa$ B, IL8 y IL6, los resultados obtenidos muestran sin embargo indicios de persistencia de respuesta celular. En efecto, la regulación de los genes codificantes de catepsina y tubulina (CTSL y TUBA3), y la sobreexpresión de genes de MHC de clase I y II, son indicadores de actividad endosomal en el órgano y de la existencia de procesos de presentación antigénica. En el mismo sentido, la activación de la señalización mediada por NFAT podría constituir un importante factor de modulación de la función y diferenciación de células Th1 y Th2.

Tabla 5. Rutas de señalización afectadas por la expresión diferencial de genes en NLM a 30 d.p.i. Rutas seleccionadas con Valor de  $p < 0,05$ .

| Rutas de señalización   | z-score | Genes   |
|---|---------|---|
| <b>Maduración de células dendríticas</b>                      | -2,6    | COL1A2,COL2A1,COL3A1,COL5A3,IL15,IL1A,KLB           |
| <b>Señalización ERK/MAPK</b>                                  | -1,6    | DUSP1,ELF4,FOS,ITGA2,KLB, SRC                       |
| <b>Señalización GNRH</b>                                      | -2,0    | FOS,MAP3K3,MAP3K6, SRC                              |
| <b>Señalización HGF</b>                                       | -2,2    | ELF4,FOS,ITGA2,KLB,MAP3K3,MAP3K6,PTGS2              |
| <b>Señalización HMGB1</b>                                     | -2,4    | CXCL8,FOS,IL1A,KLB,SELE,TGFB3                       |
| <b>Señalización IL6</b>                                       | -1,9    | A2M,CEBPB,CRP,CXCL8,FOS,IL1A,IL1R2,IL1RL1,KLB,SOCS3 |
| <b>Señalización IL8</b>                                       | -1,9    | CXCL8,FOS,KLB,NOX4,PTGS2, SRC, VEGFD                |
| <b>Señalización JAK/Stat</b>                                  | -1,0    | CEBPB,FOS,KLB,SOCS3                                 |
| <b>Señalización MAPK estimulada por LPS</b>                   |         | FOS,KLB   |
| <b>Señalización NF-<math>\kappa</math>B</b>                   | -2,0    | IL1A,IL1R2,KLB,MAP3K3                               |
| <b>Señalización PI3K/AKT</b>                                  |         | ITGA2,PTGS2   |
| <b>Señalización PPAR</b>                                      | 2,2     | FOS,IL1A,IL1R2,IL1RL1,PTGS2                         |
| <b>Producción de óxido nítrico y ROS en macrófagos</b>        | -2,0    | FOS,KLB,MAP3K3,MAP3K6                               |
| <b>Papel del NFAT en la regulación de la respuesta inmune</b> |         | CD79B,FOS,KLB                                       |
| <b>Ruta de activación de TH1 y TH2</b>                        |         | ACVR1B,IL1RL1,KLB,SOCS3                             |
| <b>Ruta de señalización TH1</b>                               |         | KLB,SOCS3   |
| <b>Ruta de señalización TH2</b>                               |         | ACVR1B,IL1RL1,KLB,SOCS3                             |

### 3. ANTÍGENOS DE *SALMONELLA* SON PRESENTADOS EN MHC DE CLASE I

Células dendríticas y macrófagos tienen la capacidad de manera eficiente de presentar antígenos internalizados en moléculas de MHC de clase I. Este proceso se denomina presentación cruzada, es importante en la generación de una respuesta inmune frente a virus y tumores y también parece jugar un papel relevante en la inmunidad frente a bacterias.

La demostración de la existencia de presentación cruzada en la salmonelosis porcina ha sido planteada en este trabajo de Tesis mediante el empleo de un modelo in vitro consistente en la utilización de células B3Z (hibridoma murino de células T CD8 +) expresando un TCR que reconoce SIINFEKL (un péptido contenido en la ovoalbúmina de huevo de gallina, OVA) en el contexto de H-2kb (MHC clase I de ratón), y simultáneamente, células 3D4/31 (línea celular mielomonocítica porcina) transfectada con H-2kb e infectada con una cepa de *Salmonella* Typhimurium transformada para expresar OVA.

En primer lugar, se estableció la capacidad fagocítica de las células 3D4/31 mediante comparación con la demostrada por los neutrófilos porcinos y la línea celular fagocítica humana THP-1. El análisis cuantitativo de la capacidad fagocítica se realizó utilizando como partículas diana, bolitas de látex fluorescentes y como técnica de estudio, la citometría de flujo. Considerando como el 100% la capacidad fagocítica de los neutrófilos, una célula especializada en esta función, el nivel de fagocitosis experimentado por las células 3D4/31 fue cercano al 50%, mayor que la capacidad demostrada de las células THP-1 empleadas como referencia en los ensayos in vitro en humano (**Figura 5**). En todos los casos, los histogramas de citometría indicaron una alta intensidad de fluorescencia, lo que

representa un número elevado de partículas por célula. En función de estos resultados consideramos que era conveniente ratificar la capacidad fagocítica de las células 3D4/31 para los ensayos posteriores.

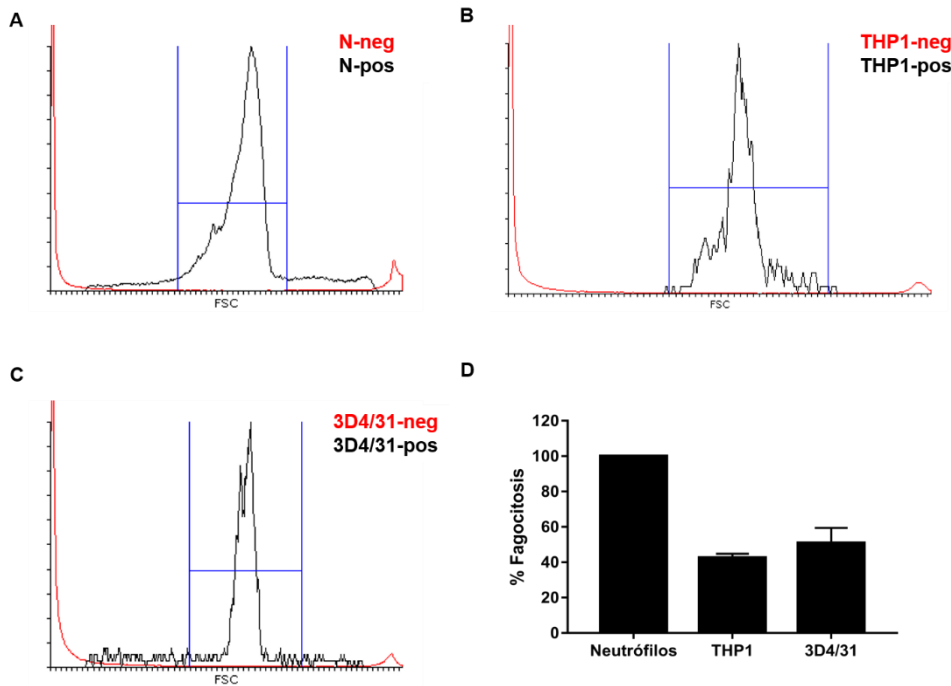


Figura 5. Estudio de la capacidad fagocítica de la línea celular 3D4/31 mediante citometría de flujo. **A.** Histograma de Neutrófilos; **B.** Histograma de la línea celular monocítica humana THP-1; **C.** Histograma de la línea celular porcina 3D4/31; **D.** Valores de fagocitosis en porcentaje de cada tipo celular en referencia a los neutrófilos (100%) tomados como control.

Las células 3D4/31, elegidas como células presentadoras de antígeno para este estudio, fueron transfectadas con una construcción recombinante en pcDNA3 del gen H2-Kb (3D4/31-H-2Kb), cedida amablemente por el Dr. Rodrigo P. Martins (Robin Fahraeus Group, INSERM U940, Instituto de Genética Molecular, Universidad de París 7, el Hospital St. Louis, París,

Francia), y a continuación infectadas con *Salmonella* Typhimuriun SL1344 transformada con una construcción recombinante en pGEMT del gen OVA (SL1344-OVA) que contiene el motivo peptídico SIINFEKL. La presentación antigénica en el contexto de MHC de clase I fue medida mediante cuantificación de la expresión de IL2 en el sobrenadante del co-cultivo de células 3D4/31 y células B3Z. La citoquina IL2 es producida por las células T-CD8+ durante su fase efectora y está relacionada con una potencial memoria inmunológica de la respuesta T dependiente. La **Figura 6** muestra que los niveles de IL2 cuantificados en las tres situaciones de control son irrelevantes en comparación con las observadas en células expresando H2-Kb y que fueron transfectadas con pcDNA3-OVA o estuvieron en contacto con el péptido SIINFEKL añadido al medio de cultivo. Curiosamente, el mayor nivel de activación de las células T-CD8+ se obtuvo al infectar las células 3D4/31-H-2Kb con la cepa SL1344-OVA lo que demuestra la existencia de procesamiento intracelular de los antígenos de *Salmonella* y su posterior presentación en H-2Kb.

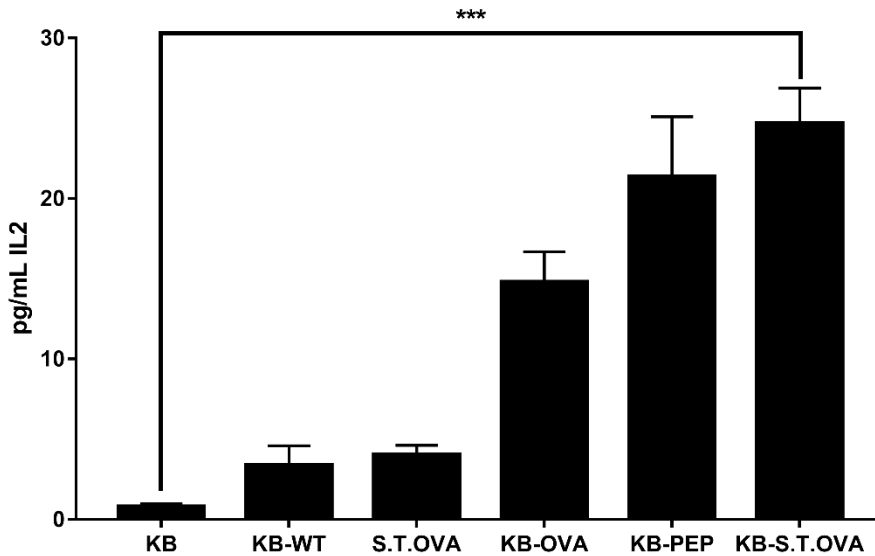


Figura 6. Producción de IL2 tras el proceso de presentación de antígenos entre las células presentadoras 3D4/31 y las células T-CD8+ B3Z. Valor de  $p < 0,001$  (\*\*\*). KB: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB; KB-WT: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB e infectadas con la bacteria SL1344 wild type (WT); S.T.OVA: Células 3D4/31 infectadas con la bacteria SL1344-OVA; KB-OVA: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB y la construcción del péptido OVA (SIINFEKL); KB-PEP: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB e incubadas con el péptido purificado SIINFEKL; KB-S.T.OVA: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB e infectadas con la bacteria SL1344-OVA.

#### 4. LA PRESENTACIÓN CRUZADA ES DEPENDIENTE DEL PROTEASOMA

De las dos vías de presentación de antígenos extracelulares en moléculas MHC de clase I, la citosólica y la vacuolar, la primera requiere de la participación del proteasoma mientras que la vía vacuolar es un proceso independiente del procesamiento de péptidos en el citoplasma. Una vía

alternativa estaría constituida por la autofagia, un proceso fisiológico que permite a la célula degradar y reciclar componentes citoplasmáticos que, en combinación con la vía vacuolar, pueden resultar presentados en los receptores de clase I. Tras el análisis de los datos de transcriptómica observamos que diversos genes codificantes de moléculas relacionadas con el complejo del proteasoma, como *NEURL3*, *PSME2* y *PSMB9* resultaron regulados tras la infección. Por otro lado, el elevado nivel de expresión a 2 d.p.i. del gen *DRAM1* que codifica para una proteína activadora de la autofagia podría sugerir la participación de este proceso celular en la presentación antigénica. El anterior modelo experimental in vitro de presentación antigénica fue empleado para dilucidar la participación de proteasoma y autofagia en la presentación de antígenos de *Salmonella* mediante la utilización de inhibidores de ambos mecanismos celulares.

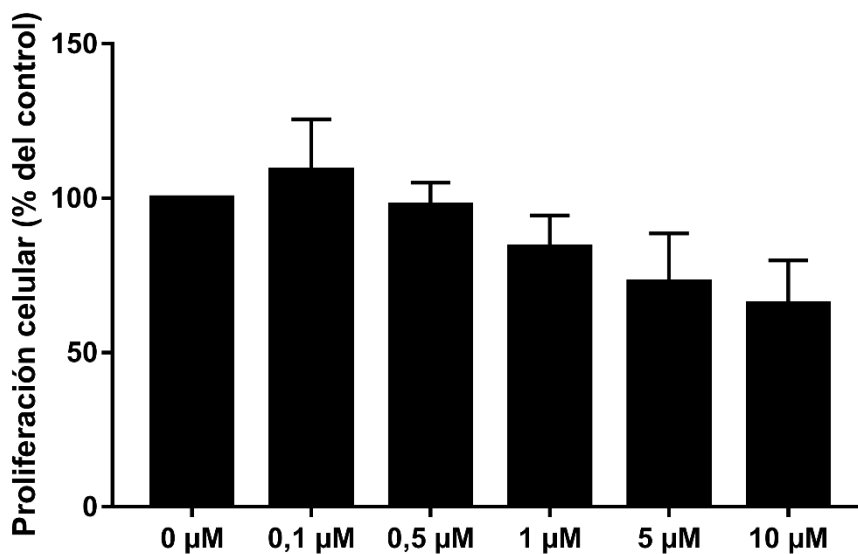
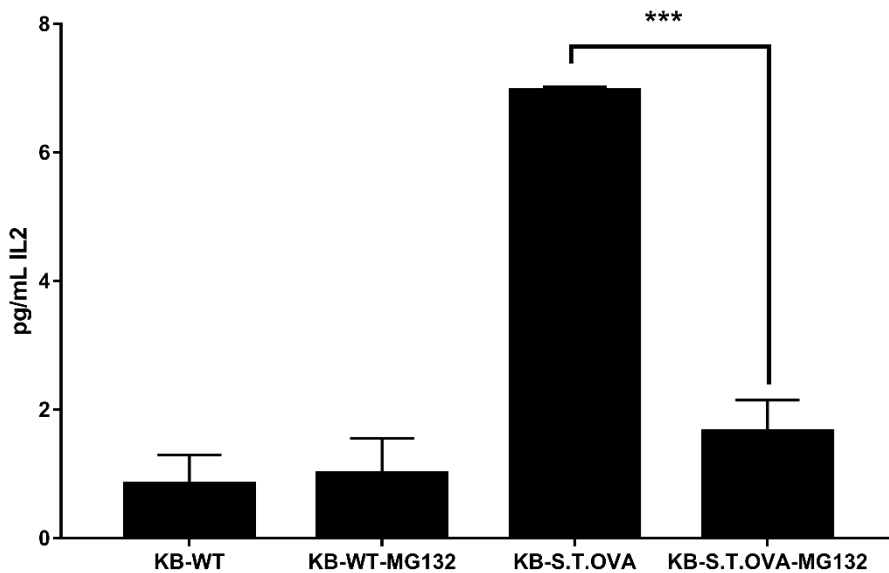


Figura 7. Efecto del inhibidor MG-132 en las células 3D4/31 a 24 horas.

Para establecer la participación del proteasoma, se empleó MG-132, un inhibidor de la actividad proteolítica del complejo citoplasmático. Previamente al ensayo de presentación antigénica, se realizó un ensayo de viabilidad celular con dicho inhibidor empleando distintas concentraciones. Los resultados obtenidos indican que, a concentraciones crecientes, la viabilidad celular va disminuyendo. Para asegurar una inhibición clara del proteasoma, fue seleccionada la concentración 0,5  $\mu$ M, ya que a partir de 1  $\mu$ M la viabilidad decrece más de un 20% (**Figura 7**).



*Figura 8. Producción de IL2 tras el proceso de presentación de antígenos entre las células presentadoras 3D4/31 y las células T-CD8+ B3Z usando el inhibidor de proteasoma MG-132. Valor de  $p < 0,001$  (\*\*\*)*. KB-WT: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB e infectadas con la bacteria SL1344 wild type (WT); KB-WT-MG132: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB infectadas con la bacteria SL1344 wild type (WT) e incubadas con el inhibidor del proteasoma MG-132; KB-S.T.OVA: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB e infectadas con la bacteria SL1344-OVA; KB-S.T.OVA-MG132: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB e infectadas con la bacteria SL1344-OVA e incubadas con el inhibidor del proteasoma MG-132.



Una vez confirmada la concentración óptima del inhibidor se llevó a cabo el ensayo de presentación cuyos resultados se muestran en la **Figura 8**. Estos resultados indican que los niveles de IL2 cuantificados en presencia del inhibidor son significativamente menores que los obtenidos en su ausencia, demostrando que la presentación de antígenos de *Salmonella* en los receptores de clase I es, al menos en parte, dependiente del procesamiento de dichos antígenos en el proteasoma.

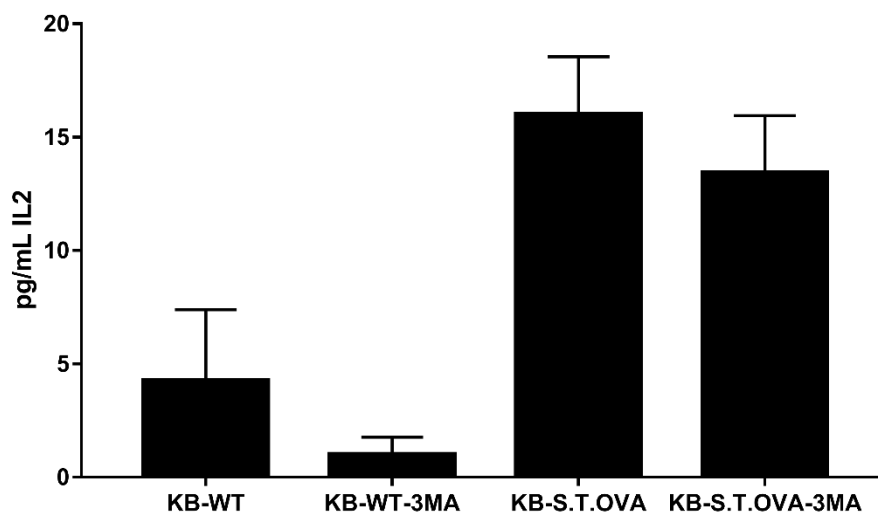


Figura 9. Producción de IL2 tras el proceso de presentación de antígenos entre las células presentadoras 3D4/31 y las células T-CD8+ B3Z usando el inhibidor de autofagia 3-Metiladenina (3-MA). KB-WT: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB e infectadas con la bacteria SL1344 wild type (WT); KB-WT-3MA: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB infectadas con la bacteria SL1344 wild type (WT) e incubadas con el inhibidor de la ruta de autofagia 3MA; KB-S.T.OVA: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB e infectadas con la bacteria SL1344-OVA; KB-S.T.OVA-3MA: Células 3D4/31 transfectadas con la construcción H2-KB e infectadas con la bacteria SL1344-OVA e incubadas con el inhibidor de la ruta de autofagia 3MA.

De manera similar, se evaluó la participación de la autofagia mediante el empleo de 3-MA, cuya función está basada en la inhibición de la actividad de la PI3K, esencial para la inducción de autofagia. Los resultados del ensayo de presentación con células 3D4/31-H2-Kb infectadas con la cepa SL1344-OVA se muestran en la **Figura 9**, en la que no se observan diferencias significativas en la cuantificación de IL2 en presencia y ausencia del inhibidor, indicando que la autofagia no parece tener una función relevante como vía de presentación de antígenos de *Salmonella* en los receptores de MHC de clase I.

## Discusión

Los NLMs juegan un papel fundamental en la protección frente a enteropatógenos como *Salmonella*, actuando como centinelas de antígenos en el tracto gastrointestinal (von Andrian and Mempel, 2003). En ellos, las células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) funcionan como primera barrera de defensa del sistema inmune frente a patógenos. Esta función de barrera, característica en procesos de inflamación aguda, puede describirse desde un punto de vista físico debido a los procesos de acumulación y reclutamiento, mediados por citoquinas, previamente descritos (Butterfield et al., 2006; Kaplanski et al., 2003; Lee et al., 1993; Serhan and Savill, 2005). En nuestros resultados vemos que a día 2 post infección (2 d.p.i.) se produce una fuerte respuesta inflamatoria mediada por citoquinas (IL6, IL8, TNF e IFN) y quimioquinas (familias CCL y CXC) que ya han sido clásicamente descritas como mediadores y potenciadores de los procesos de reclutamiento celular (Kaplanski et al., 2003). Sin embargo, a día 30 esas funciones ya no se encuentran activadas, lo cual podemos relacionar directamente con los resultados histológicos e inmunohistoquímicos mostrados en el capítulo 1 de esta tesis, donde se ve como a 2 d.p.i. los NLMs presentan una gran carga bacteriana localizada en los citoplasmas de las células inmunes.

Entre las vías de señalización inflamatorias activadas a 2 d.p.i. se encuentran las lideradas por NF- $\kappa$ B y p38 MAP kinasas, así como por potenciadores de la respuesta inmune como HMGB1. A nivel molecular, esto significa que las células residentes en el NLM (células epiteliales, macrófagos, neutrófilos, etc.) disponen de múltiples receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) para el reconocimiento específico de PAMPs (Brubaker et al., 2015). También es importante destacar la actividad

de dos rutas esenciales en la defensa frente a patógenos, como el inflamasoma y la autofagia. Existen tres clases de PRRs descritos en vertebrados, los TLRs, los RLRs (receptores tipo RIG) y los NLRs (nucleotide-binding oligomerization like receptors). Estos últimos, están presentes en el citoplasma y ejercen una importante función en la regulación de la respuesta inmunitaria frente a la invasión bacteriana, mediante el reconocimiento de PAMPs intracelulares y el control de diversas rutas de señalización implicadas en la defensa frente a la infección (Zhang et al., 2018). Estudios previos en nuestro grupo de investigación mostraron resultados relacionados con la implicación de un aumento de la expresión de la molécula NLRC5 en NLMs infectados por *Salmonella*, relacionando, a su vez, dicha molécula con la activación de la respuesta inmune asociada a la activación de las células T-CD8+ (Martins et al., 2013b).

Los NLMs son el lugar preferente de presentación antigénica en la respuesta inmune adaptativa, desencadenando la activación de la respuesta inmune mediada por células T (Beauvillain et al., 2007; Megiovanni et al., 2006; Morel et al., 2008). También se ha visto que la bacteria puede usar las células fagocíticas como medio de transporte para viajar desde el tejido intestinal a otros órganos del cuerpo, como por ejemplo los NLMs (Fu et al., 2014; Kirby et al., 2009), y que *Salmonella* puede sobrevivir y replicarse en NLMs (Martins et al., 2013a; Pickard et al., 2017). Además de encontrar la bacteria presente en células inmunes, hay trabajos que demuestran que también se localiza en células del tejido conectivo, como los fibroblastos (Garcia-del Portillo, 2001; Stewart et al., 2011). En nuestro estudio a 30 d.p.i., la bacteria sólo se localiza en la zona trabecular del tejido linfoide, posiblemente en células de tipo conectivo (fibroblastos). De ser así, *Salmonella* pasaría desapercibida, quedando en estado latente de persistencia en el organismo. Esto además apoyaría la ausencia de un

estado inflamatorio en los datos de transcriptómica a 30 d.p.i. En futuros estudios sería de interés analizar la carga bacteriana específica de fibroblastos, o co-localizar mediante inmunohistoquímica la presencia de bacteria y de fibroblastos con anticuerpos específicos para cada tipo celular.

La presentación de antígenos está mediada por moléculas MHC de clase I y II, formados por distintos antígenos leucocitarios. Las vías clásicas de procesamiento de antígenos son la extracelular y la intracelular. La primera (extracelular o exógena) da lugar a la formación del fagosoma, que procesará los péptidos bacterianos para su presentación en moléculas MHC de clase II para ser reconocidos por células T CD4+ (helper, Th1 y Th2, principalmente), mientras que la segunda (intracelular o endógena) se basa en la actividad del proteasoma, que translocará el péptido al retículo endoplásmico para ser presentado en MHC de clase I para ser reconocido por células T CD8+ (citotóxicos). Las moléculas de clase I se expresan de forma constitutiva en prácticamente todas las células nucleadas, mientras que los de clase II se expresan principalmente en células dendríticas, linfocitos B y macrófagos. La expresión de las moléculas de MHC aumenta o disminuye debido a la presencia de las citoquinas producidas durante las diferentes respuestas inmunes (Wieczorek et al., 2017). Los péptidos bacterianos generados durante una infección (como es el caso de nuestro estudio) son únicamente reconocidos por el sistema inmune a través de la activación de las células CD4+ (Platzer et al., 2014). *Salmonella* es un patógeno extracelular, por lo que sigue la vía exógena de procesamiento de antígenos. En nuestro estudio encontramos activación de genes relacionados con la proliferación de células T y la activación de células presentadoras, así como sobreexpresión de moléculas MHC de clase II que indican la existencia de respuesta Th-dependiente.

Sin embargo, se conoce que los patógenos bacterianos gram negativos son capaces de formar vesículas durante el proceso de invasión para influir en

los mecanismos de defensa del hospedador, por ejemplo, secretando factores de virulencia en su interior. Estas vesículas, a su vez, presentan moléculas que son reconocidas por los receptores intracelulares para desencadenar distintas cascadas de señalización de respuesta inmune. Por tanto, *Salmonella* puede seguir también la vía endocítica de procesamiento de antígenos. Es este estudio se aprecia activación de genes pertenecientes a dicha vía intracelular, como son aquellos pertenecientes a la actividad del proteasoma y los implicados en procesamiento de péptidos citosólicos (dependiente de proteínas TAP). Esto, junto a la sobreexpresión de genes de MHC de clase I, evidencian la presentación cruzada (o *cross-presentation*), que es la presentación de antígenos exógenos mediante la vía endógena en moléculas de clase I. Además, en nuestros datos vemos la sobreexpresión de IFNG y TNF, que juegan un papel crucial desencadenando la degradación de péptidos en el proteasoma favoreciendo la actividad del MHC clase I.

El estudio transcriptómico de NLMs en la infección por *Salmonella* reveló una regulación positiva de genes que codifican moléculas involucradas en diferentes pasos de la vía de presentación de antígeno a través de MHC de clase I. Por ejemplo, *BATF2* es un factor de transcripción de la familia de genes AP1 que controla la diferenciación de células específicas en el sistema inmune. Después de la infección, participa en la diferenciación de las células dendríticas tímicas convencionales T-CD8+ en el sistema inmune (Kayama et al., 2019). También se vio que estaba sobreexpresado, y siendo una molécula esencial en toda la dinámica de activación de respuesta inmune y posible estado de presentación antigénica, el IFN $\gamma$ , seguido de moléculas activadoras de señal como STAT1 (Kim and Maniatis, 1996; Ramana et al., 2002). El tejido infectado también mostró altos niveles de un marcador de activación de células T denominado *CD6* (Bughani et al., 2018) y sobreexpresión de *CXCL2*, *CXCL8*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*,

*CXCL12* y *CXCL16* todos fuertes inductores de la activación de linfocitos citotóxicos y células T-CD4+ y T-CD8+ (Hickman et al., 2015; Karin et al., 2016). También están presentes en altos niveles el receptor de quimiocinas *ACKR2* implicado en el reclutamiento de células inmunes en la zona de inflamación (Bonavita et al., 2016; Elhadad and Della Bella, 2017), *ADGRE1* y *ADGRE5*, ambos involucrados en la adhesión e interacción célula-célula de células inmunes (Shi et al., 2019; Waddell et al., 2018; Wang et al., 2016). La familia de proteínas S100, destacando las *S100A8*, *S100A9* y *S100A12* están involucradas en la respuesta antimicrobiana. El gen *PADI4* también desempeña un papel en el desarrollo de granulocitos y macrófagos que conduce a la inflamación y la respuesta inmune afectando directamente a la descondensación de cromatina durante la respuesta inmune innata (Cheung et al., 2018; Zheng et al., 2016). *NEURL3* es una ubiquitina-proteína ligasa que participa en el marcaje de moléculas para dirigir las a la degradación mediada por el proteasoma (Kumar et al., 2019; Liu et al., 2018). Otros genes que hemos visto relacionados con la actividad del proteasoma, a parte de los citados previamente, son *PSME2* y *PSMB9*. Ambos forman parte estructural del complejo del proteasoma, por lo que están directamente relacionados con el procesamiento de antígenos (Kasahara and Flajnik, 2019). El hecho de tener proteínas relacionadas con la ubiquitinación y el procesamiento de antígenos nos lleva a proponer que existen evidencias de que se está activando el proceso de presentación cruzada, lo que sugiere que, además de provocar respuestas inmunes mediadas por células B, los nódulos linfáticos podrían estar implicados en el proceso de generación y activación de las células T-CD8+ de memoria durante las infecciones por *Salmonella*.

Para comprobar de manera experimental si se presentan antígenos de *Salmonella* en clase I, usamos un sistema previamente caracterizado por el grupo de investigación del Dr. Robin Fåhræus y el Dr. Prado-Martins, donde

realizan estudios de presentación de moléculas dirigidas hacia la activación de células T-CD8+ causada por la presencia del péptido SIINFEKL del gen de la ovoalbúmina. Las células empleadas como T-CD8+ son la línea celular B3Z, las cuales reconocen solo y exclusivamente el péptido OVA presentado por el H2KB murino (Martins and Fahraeus, 2017; Martins et al., 2019). En nuestro caso se incorporó la presencia de este péptido señal a *Salmonella* Typhimurium mediante transformación de la bacteria con una construcción del gen de la ovoalbúmina completo. Nuestros resultados indican que las células 3D4/31 porcinas son capaces de metabolizar la bacteria de forma que presentan el péptido dirigido hacia la vía de presentación en clase I, y el uso de un compuesto inhibidor del proteasoma indica que dicha presentación es dependiente de la actividad del proteasoma. Con estos resultados integrados con lo descrito en los datos de transcriptómica se demuestra la presentación cruzada en este estudio. Existe por tanto una activación de células presentadoras de antígenos que intervienen en la presentación de antígenos extracelulares a través de las moléculas de MHC clase I a las células T-CD8+, definiendo así, por tanto, el proceso de presentación cruzada (Houde et al., 2003; Schetters et al., 2019).

Se ha descrito que el proteasoma y la autofagia son dos procesos que funcionan en paralelo durante la vida de la célula. Sin embargo, existen estudios que indican la existencia de múltiples puntos de comunicación entre los dos sistemas en diferentes niveles de regulación. Además de sus funciones específicas del sistema, ambos también están involucrados en la regulación de procesos celulares similares, como la respuesta al estrés celular, el control de la vida media de las proteínas, el proceso de apoptosis y la presentación de antígenos (Morishita and Mizushima, 2019). Por todo esto y haciendo alusión a los resultados descritos en el capítulo 3, decidimos usar el inhibidor de autofagia 3-MA en este estudio de



presentación antigénica. Los datos previos obtenidos nos indicaban que la ruta de autofagia está directamente relacionada con el proceso de internalización de la bacteria y con el mantenimiento del fagosoma. Pero nos preguntamos, si este proceso, tan esencial para la célula, interviene directamente en el proceso de presentación antigénica. Se ha descrito que la autofagia actúa más como un proceso de reciclaje y eliminación de proteínas que como vía de presentación antigénica (Cohen-Kaplan et al., 2016). No obstante, hay estudios que relacionan esta vía con el procesamiento de antígenos para ser presentados por la vía MHC de clase II (Cohen-Kaplan et al., 2016). Con los datos obtenidos vemos los mismos niveles de presentación con y sin inhibidor de autofagia, lo cual nos hace pensar que de estar el proceso de autofagia directamente relacionado con la vía de presentación MHC de clase II, no afecta en los péptidos presentados por MHC de clase I que es lo que pensamos que está ocurriendo en nuestro diseño experimental.



# **Conclusiones**



Las conclusiones de esta tesis doctoral son:

1. El valor más elevado de colonización ejercido por *S. Typhimurium* es a 2 d.p.i. (fase aguda de la infección), donde *Salmonella* está presente tanto en el tejido (íleon y NLM) como en heces (diseminación bacteriana).
2. A pesar de observar la ausencia de *Salmonella* en los tramos intestinales a 30 d.p.i. (fase crónica de la infección), existe un estado latente o persistente asociado a la presencia de *Salmonella* en las trabéculas de los NLMs.
3. La profundidad de secuenciación empleada en las muestras de íleon y NLM no fue suficiente para lograr obtener una información detallada de *Salmonella*.
4. La mucosa de íleon infectada a 2 d.p.i. con *S. Typhimurium* presenta una elevada respuesta inflamatoria mediada, principalmente, por 2 citoquinas, IL1 y TNF.
5. El metabolismo de los lípidos y sus vías de señalización, relacionadas con FXR y RXR, están desreguladas a causa de la respuesta inflamatoria provocada, principalmente, por IL1, lo que condujo a la interrupción del ciclo de absorción de las sales biliares en la mucosa de íleon y en hígado a 2 d.p.i.
6. La infección de la línea celular IPI-2I a 24 h.p.i. provoca una fuerte respuesta inflamatoria a nivel transcripcional caracterizada por la mediación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B y la presencia de moléculas de carácter antimicrobiano.
7. *Salmonella* modula la ruta de la autofagia en su propio beneficio, durante el proceso de infección de las células IPI-2I, para el establecimiento del nicho de replicación en el citoplasma celular.
8. El perfil transcripcional de *Salmonella*, durante la infección de la línea epitelial porcina IPI-2I, revela la activación de numerosos genes

ligados a la patogénesis donde destacan, principalmente, efectores pertenecientes a las SPI-1 y SPI-2.

9. En NLM a 2 d.p.i. se produce una interacción entre la activación de la respuesta inmune innata y la adquirida, mediada principalmente por *IFNG*.

10. En NLM a 2 d.p.i. se produce una alteración de procesos biológicos relacionados con activación de respuesta inflamatoria a consecuencia del reconocimiento mediado por TLR y la activación del inflammasoma, que contribuyen a la activación de la respuesta innata y muerte celular por piroptosis, procesos que desaparecen a 30 d.p.i.

11. Durante la infección por *Salmonella* en NLMs hay presentación de antígenos bacterianos en moléculas MHC-I y MHC-II, ocurriendo el fenómeno de “presentación cruzada”, en el cual péptidos bacterianos extracelulares son procesados mediante la vía intracelular y presentados en MHC-I.

12. La autofagia, pese a estar relacionada con la supervivencia intracelular y mantenimiento del fagosoma, no está relacionada con la presentación de péptidos bacterianos en moléculas MHC-I.

## **Bibliografía**





Agbayani, G., Wachholz, K., Chattopadhyay, A., Gurnani, K., Murphy, S.P., Krishnan, L., 2017. Modulation of Th17 and regulatory T-cell responses during murine pregnancy contributes to increased maternal susceptibility to *Salmonella* Typhimurium infection. *Am J Reprod Immunol* 78 (6).

Alban, L., Baptista, F.M., Møgelmoose, V., Sørensen, L.L., Christensen, H., Aabo, S., Dahl, J., 2012. *Salmonella* surveillance and control for finisher pigs and pork in Denmark -a case study. *Food Res. Int.* 45, 656-665.

Albornoz, N., Bustamante, H., Soza, A., Burgos, P., 2019. Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3379

Alpuche-Aranda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A., Miller, S.I., 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 179, 601-608.

Alvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M., Messens, W., Lopez, M., Bernardo, A., Hill, C., 2011. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology* 157, 3268-3281.

Amavisit, P., Lightfoot, D., Browning, G.F., Markham, P.F., 2003. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J Bacteriol* 185, 3624-3635.

Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64, 5245-5250.

Annaba, F., Sarwar, Z., Gill, R.K., Ghosh, A., Saksena, S., Borthakur, A., Hecht, G.A., Dudeja, P.K., Alrefai, W.A. 2012. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits ileal sodium-dependent bile acid transporter ASBT, In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* G1216-1222.

Arce, C., Ramirez-Boo, M., Lucena, C., Garrido, J.J., 2010. Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I) in response to LPS from *Salmonella* Typhimurium. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33, 161-174.

Arguello, H., Estelle, J., Zaldivar-Lopez, S., Jimenez-Marin, A., Carvajal, A., Lopez-Bascon, M.A., Crispie, F., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Priego-Capote, F., Morera, L., Garrido, J.J., 2018. Early *Salmonella* Typhimurium infection in pigs disrupts Microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. *Sci Rep* 8, 7788.

Arguello, H., Sorensen, G., Carvajal, A., Baggesen, D.L., Rubio, P., Pedersen, K., 2013. Prevalence, serotypes and resistance patterns of *Salmonella* in Danish pig production. *Res Vet Sci* 95, 334-342.

Baison-Olmo, F., Cardenal-Munoz, E., Ramos-Morales, F., 2012. PipB2 is a substrate of the *Salmonella* pathogenicity island 1-encoded type III secretion system. *Biochem Biophys Res Commun* 423, 240-246.

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., Latz, E., 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183, 787-791.

Baumler, A.J., Tsois, R.M., Ficht, T.A., Adams, L.G., 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella* enterica. *Infect Immun* 66, 4579-4587.

Beauvillain, C., Delneste, Y., Scotet, M., Peres, A., Gascan, H., Guernonprez, P., Barnaba, V., Jeannin, P., 2007. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood* 110, 2965-2973.

Behnsen, J., Perez-Lopez, A., Nuccio, S.P., Raffatellu, M., 2015. Exploiting host immunity: the *Salmonella* paradigm. *Trends Immunol* 36, 112-120.

Bianchi, M.E., 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5.

Binns, R.M., Pabst, R., 1994. Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 43, 79-87.

Bonavita, O., Mollica Poeta, V., Setten, E., Massara, M., Bonecchi, R., 2016. ACKR2: An Atypical Chemokine Receptor Regulating Lymphatic Biology. *Front Immunol* 7, 691.

Boughton, C., Egan, J., Kelly, G., Markey, B., Leonard, N., 2007. Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis* 4, 33-40.

Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R., Pasmans, F., 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet Microbiol* 130, 1-19.

Boyen, F., Pasmans, F., Donne, E., Van Immerseel, F., Morgan, E., Adriaensen, C., Hernalsteens, J.P., Wallis, T.S., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2006. The fibronectin binding protein ShdA is not a prerequisite for long term faecal shedding of *Salmonella* Typhimurium in pigs. *Vet Microbiol* 115, 284-290.

Boyle, E.C., Bishop, J.L., Grassl, G.A., Finlay, B.B., 2007. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. *J Bacteriol* 189, 1489-1495.

Brodsky, I.E., Ghori, N., Falkow, S., Monack, D., 2005. Mig-14 is an inner membrane-associated protein that promotes *Salmonella* Typhimurium resistance to CRAMP, survival within activated macrophages and persistent infection. *Mol Microbiol* 55, 954-972.

Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., Kagan, J.C., 2015. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* 33, 257-290.

Brumell, J.H., Goosney, D.L., Finlay, B.B., 2002. SifA, a type III secreted effector of *Salmonella* Typhimurium, directs *Salmonella*-induced filament (Sif) formation along microtubules. *Traffic* 3, 407-415.

Bughani, U., Saha, A., Kuriakose, A., Nair, R., Sadashivarao, R.B., Venkataraman, R., Patel, S., Tushar Deshchougule, A., Satish, K.S., Montero, E., Pai, H.V., Palanivelu, D.V., Melarkode, R., Nair, P., 2018. Correction: T cell activation and differentiation is modulated by a CD6 domain 1 antibody Itolizumab. *PLoS One* 13, e0192335.

Bullido, R., Gomez del Moral, M., Alonso, F., Ezquerro, A., Zapata, A., Sanchez, C., Ortuno, E., Alvarez, B., Dominguez, J., 1997. Monoclonal antibodies specific for porcine monocytes/macrophages: macrophage heterogeneity in the pig evidenced by the expression of surface antigens. *Tissue Antigens* 49, 403-413.

Butterfield, T.A., Best, T.M., Merrick, M.A., 2006. The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation: A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair. *J Athl Train* 41, 457-465.

Casanova, J.E., 2017. Bacterial Autophagy: Offense and Defense at the Host-Pathogen Interface. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 4, 237-243.

CDC, 2019. Questions and Answers | *Salmonella* | CDC  
<https://www.cdc.gov/Salmonella/general>

Chen, G.Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., Núñez, G., 2011. A Functional Role for Nlrp6 in Intestinal Inflammation and Tumorigenesis. *J Immunol.* 2011;186(12):7187–7194

Cheung, P., Vallania, F., Warsinske, H.C., Donato, M., Schaffert, S., Chang, S.E., Dvorak, M., Dekker, C.L., Davis, M.M., Utz, P.J., Khatri, P., Kuo, A.J., 2018. Single-Cell Chromatin Modification Profiling Reveals Increased Epigenetic Variations with Aging. *Cell* 173, 1385-1397.e1314.

Cho, J.H., 2008. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 8, 458-466.

Chubiz, J.E., Golubeva, Y.A., Lin, D., Miller, L.D., Slauch, J.M., 2010. FlhZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. J Bacteriol 192, 6261-6270.

Cohen-Kaplan, V., Livneh, I., Avni, N., Cohen-Rosenzweig, C., Ciechanover, A., 2016. The ubiquitin-proteasome system and autophagy: Coordinated and independent activities. Int J Biochem Cell Biol 79, 403-418.

Collado-Romero, M., Arce, C., Ramirez-Boo, M., Carvajal, A., Garrido, J.J., 2010. Quantitative analysis of the immune response upon *Salmonella* Typhimurium infection along the porcine intestinal gut. Vet Res 41, 23.

Dalebroux, Z.D., Miller, S.I., 2014. *Salmonellae* PhoPQ regulation of the outer membrane to resist innate immunity. Curr Opin Microbiol 17, 106-113.

De Nardo, D., 2015. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. Cytokine 74, 181-189.

den Dunnen, J., Vogelpoel, L.T., Wypych, T., Muller, F.J., de Boer, L., Kuijpers, T.W., Zaat, S.A., Kapsenberg, M.L., de Jong, E.C., 2012. IgG opsonization of bacteria promotes Th17 responses via synergy between TLRs and FcγR1a in human dendritic cells. Blood 120, 112-121.

Desai, P.T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Bhonagiri-Palsikar, V., Hallsworth-Pepin, K., Clifton, S.W., Weinstock, G.M., McClelland, M., 2013. Evolutionary Genomics of *Salmonella* enterica Subspecies. mBio. 2013;4(2):e00198-13

Detweiler, C.S., Monack, D.M., Brodsky, I.E., Mathew, H., Falkow, S., 2003. virK, somA and rcsC are important for systemic *Salmonella* enterica serovar Typhimurium infection and cationic peptide resistance. Mol Microbiol 48, 385-400.

Eade, C.R., Hung, C.C., Bullard, B., Gonzalez-Escobedo, G., Gunn, J.S., Altier, C., 2016. Bile Acids Function Synergistically To Repress Invasion Gene Expression in *Salmonella* by Destabilizing the Invasion Regulator HilD. Infect Immun 84, 2198-2208.

Eckmann, L., Kagnoff, M.F., 2001. Cytokines in host defense against *Salmonella*. Microbes Infect 3, 1191-1200.

Edwards, R.A., Olsen, G.J., Maloy, S.R., 2002. Comparative genomics of closely related *Salmonellae*. Trends Microbiol 10, 94-99.

EFSA 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018;16(12):5500.

Elhadad, S., Della Bella, S., 2017. Editorial: Cross Talk between Lymph Node Lymphatic Endothelial Cells and T-Cells during Inflammation and Cancer. Front Immunol 8, 1421.

Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., Flavell, R.A., 2011. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. Cell 145, 745-757.

Eswarappa, S.M., Negi, V.D., Chakraborty, S., Chandrasekhar Sagar, B.K., Chakravorty, D. 2010. Division of the *Salmonella*-Containing Vacuole and Depletion of Acidic Lysosomes in *Salmonella*-Infected Host Cells Are Novel Strategies of *Salmonella enterica* To Avoid Lysosomes, Infect Immun. 68-79.

Fedorka-Cray, P., Kelley LC, Stabel TJ, 1995. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. Infect Immun 63(7), 2658–2664.

Feng, Z.Z., Jiang, A.J., Mao, A.W., Feng, Y., Wang, W., Li, J., Zhang, X., Xing, K., Peng, X., 2018. The *Salmonella* effectors SseF and SseG inhibit Rab1A-mediated autophagy to facilitate intracellular bacterial survival and replication. J Biol Chem 293, 9662-9673.

Fernandez-Santoscoy, M., Wenzel, U.A., Yrlid, U., Cardell, S., Backhed, F., Wick, M.J., 2015. The Gut Microbiota Reduces Colonization of the Mesenteric Lymph Nodes and IL-12-Independent IFN-gamma Production During *Salmonella* Infection. Front Cell Infect Microbiol 5, 93.

Ferrero, M.C., Fossati, C.A., Rumbo, M., Baldi, P.C., 2012. Brucella invasion of human intestinal epithelial cells elicits a weak proinflammatory response but a significant CCL20 secretion. FEMS Immunol Med Microbiol 66, 45-57.

Figueira, R., Holden, D.W., 2012. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. Microbiology 158, 1147-1161.

Fink, S.L., Cookson, B.T., 2007. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. Cell Microbiol 9, 2562-2570.



Folkesson, A., Lofdahl, S., Normark, S., 2002. The *Salmonella* enterica subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. Res Microbiol 153, 537-545.

Fu, Y., Chang, F.M., Giedroc, D.P., 2014. Copper transport and trafficking at the host-bacterial pathogen interface. Acc Chem Res 47, 3605-3613.

Galán, J.E., Zhou, D. 2000. Striking a balance: Modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*, In: Proc Natl Acad Sci U S A. 8754-8761.

Garcia-del Portillo, F., 2001. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? Microbes Infect 3, 1305-1311.

Garcia-Del Portillo, F., Pucciarelli, M.G., 2017. RNA-Seq unveils new attributes of the heterogeneous *Salmonella*-host cell communication. RNA Biol 14, 429-435.

Garcia-Feliz, C., Collazos, J.A., Carvajal, A., Vidal, A.B., Aladuena, A., Ramiro, R., de la Fuente, M., Echeita, M.A., Rubio, P., 2007. *Salmonella* enterica infections in Spanish swine fattening units. Zoonoses Public Health 54, 294-300.

Garner MJ, Hayward RD, Koronakis V. The *Salmonella* pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking. Cell Microbiol. 2002;4(3):153–165

Ge, Y., Gong, M., Zadeh, M., Li, J., Abbott, J.R., Li, W., Morel, L., Sonon, R., Supekar, N.T., Azadi, P., Wang, Y., Jones, D.P., Li, S., Mohamadzadeh, M., 2019. Regulating colonic dendritic cells by commensal glycosylated large surface layer protein A to sustain gut homeostasis against pathogenic inflammation. *Mucosal Immunol.* 2020;13(1):34–46

Gewirtz, A.T., Rao, A.S., Simon, P.O., Merlin, D., Carnes, D., Madara, J.L., Neish, A.S. 2000. *Salmonella* Typhimurium induces epithelial IL-8 expression via Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of the NF-κB pathway, *J Clin Invest.* 79-92.

Goncalves, A., Roi, S., Nowicki, M., Dhaussy, A., Huertas, A., Amiot, M.J., Reboul, E., 2015. Fat-soluble vitamin intestinal absorption: absorption sites in the intestine and interactions for absorption. *Food Chem* 172, 155-160.

Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Stabel TJ, Kramer TT. Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62(1):141–146.

Grimont, F., Lejay-Collin, M., Talukder, K.A., Carle, I., Issenhuth, S., Le Roux, K., Grimont, P.A., 2007. Identification of a group of shigella-like isolates as *Shigella boydii* 20. *J Med Microbiol* 56, 749-754.

Grimont, P., Weill, F.-X., 2007. Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur., 1-166.

Groisman, E.A., Ochman, H., 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5, 343-349.

Hagar, J.A., Powell, D.A., Aachoui, Y., Ernst, R.K., Miao, E.A., 2013. Cytoplasmic LPS Activates Caspase-11: Implications in TLR4-Independent Endotoxic Shock. *Science*. 2013;341(6151):1250–1253.

Haller, O., Staeheli, P., Kochs, G., 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89, 812-818.

Hampton, H.R., Bailey, J., Tomura, M., Brink, R., Chtanova, T., 2015. Microbe-dependent lymphatic migration of neutrophils modulates lymphocyte proliferation in lymph nodes. *Nat Commun* 6, 7139.

Hansen-Wester, I., Hensel, M., 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 3, 549-559.

Hapfelmeier, S., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M., Muller, A.J., Heikenwalder, M., Stallmach, T., Hensel, M., Pfeffer, K., Akira, S., Hardt, W.D., 2005. The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar Typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 174, 1675-1685.

Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I., 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6, 53-66.

Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M., Johnson, L.L., Swain, S.L., Lund, F.E., 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 1, 475-482.

Harris, J.C., Dupont, H.L., Hornick, R.B., 1972. Fecal leukocytes in diarrheal illness. *Ann Intern Med* 76, 697-703.

Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M.L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R.J., Ahmad, N., Rhen, M., Hinton, J.C., 2008. During infection of epithelial cells *Salmonella* enterica serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol* 10, 958-984.

Helaine, S., Cheverton, A.M., Watson, K.G., Faure, L.M., Matthews, S.A., Holden, D.W., 2014. Internalization of *Salmonella* by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters. *Science* 343, 204-208.

Hensel, M., 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella* enterica. *Int J Med Microbiol* 294, 95-102.

Hensel, M., Shea, J.E., Raupach, B., Monack, D., Falkow, S., Gleeson, C., Kubo, T., Holden, D.W., 1997. Functional analysis of ssaJ and the ssaK/U operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol Microbiol* 24, 155-167.

Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C., Holden, D.W., 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 30, 163-174.

Hickman, H.D., Reynoso, G.V., Ngudiankama, B.F., Cush, S.S., Gibbs, J., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2015. CXCR3 chemokine receptor enables local CD8(+) T cell migration for the destruction of virus-infected cells. *Immunity* 42, 524-537.

Hoelzer, K., Moreno Switt, A.I., Wiedmann, M., 2011. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet Res* 42, 34.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D., Desjardins, M., 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.

Huang, J., Canadien, V., Lam, G.Y., Steinberg, B.E., Dinanuer, M.C., Magalhaes, M.A.O., Glogauer, M., Grinstein, S., Brumell, J.H., 2009. Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(15):6226–6231

Hunter, T., 2007. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* 28, 730-738.

Hurd, H.S., McKean, J.D., Griffith, R.W., Wesley, I.V., Rostagno, M.H., 2002. *Salmonella* enterica infections in market swine with and without transport and holding. *Appl Environ Microbiol* 68, 2376-2381.

Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-995.

Jacobsen, A., Hendriksen, R.S., Aaresturp, F.M., Ussery, D.W., Friis, C., 2011. The *Salmonella* enterica pan-genome. *Microb Ecol* 62, 487-504.

Jiang, J., Natarajan, K., Margulies, D.H., 2019. MHC Molecules, T cell Receptors, Natural Killer Cell Receptors, and Viral Immune-evasins-Key Elements of Adaptive and Innate Immunity. *Adv Exp Med Biol* 1172, 21-62.

Jones, B.D., Ghori, N., Falkow, S., 1994. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180, 15-23.

Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., Alnemri, E.S., 2012. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* 287, 36617-36622.

Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., Farnarier, C., 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24, 25-29.

Karin, N., Wildbaum, G., Thelen, M., 2016. Biased signaling pathways via CXCR3 control the development and function of CD4<sup>+</sup> T cell subsets. *J Leukoc Biol* 99, 857-862.

Kasahara, M., Flajnik, M.F., 2019. Origin and evolution of the specialized forms of proteasomes involved in antigen presentation. *Immunogenetics* 71, 251-261.

Kawai, T., Akira, S., 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 17, 338-344.

Kayama, H., Tani, H., Kitada, S., Opasawatchai, A., Okumura, R., Motooka, D., Nakamura, S., Takeda, K., 2019. BATF2 prevents T-cell-mediated intestinal inflammation through regulation of the IL-23/IL-17 pathway. *Int Immunol* 31, 371-383.

Kelly, B.G., Vespermann, A., Bolton, D.J., 2009. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol* 47, 951-968.

Kim, T.K., Maniatis, T., 1996. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1717-1719.

Kirby, A.C., Coles, M.C., Kaye, P.M., 2009. Alveolar macrophages transport pathogens to lung draining lymph nodes. *J Immunol* 183, 1983-1989.

Knegt, d.L., Pires, S.M., Hald, T., 2015. Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. *Epidemiol Infect* 143, 1175-1186.

Knodler, L.A., Celli, J., Hardt, W.D., Vallance, B.A., Yip, C., Finlay, B.B., 2002. *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol Microbiol* 43, 1089-1103.

Kolodziejek, A.M., Miller, S.I., 2015. *Salmonella* modulation of the phagosome membrane, role of SseJ. *Cell Microbiol* 17, 333-341.

Koraka, P., Martina, B.E.E., Smreczak, M., Orlowska, A., Marzec, A., Trebas, P., Roose, J.M., Begeman, L., Gerhauser, I., Wohlsein, P., Baumgartner, W., Zmudzinski, J., A, D.M.E.O., 2019. Inhibition of caspase-1 prolongs survival of mice infected with rabies virus. *Vaccine* 37, 4681-4685.

Kreibich, S., Emmenlauer, M., Fredlund, J., Ramo, P., Munz, C., Dehio, C., Enninga, J., Hardt, W.D., 2015. Autophagy Proteins Promote Repair of Endosomal Membranes Damaged by the *Salmonella* Type Three Secretion System 1. *Cell Host Microbe* 18, 527-537.

Kroger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Handler, K., Sivasankaran, S.K., Hammarlof, D.L., Canals, R., Grissom, J.E., Conway, T., Hokamp, K., Hinton, J.C., 2013. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* 14, 683-695.

Kumar, R., Derbigny, W.A., Microbiology and Immunology, S.o.M., 2019. TLR3 Deficiency Leads to a Dysregulation in the Global Gene-Expression Profile in Murine Oviduct Epithelial Cells Infected with *Chlamydia muridarum*. *Int J Microbiol Curr Res.* 2019;1(1):1–13.

LaRock, D.L., Chaudhary, A., Miller, S.I., 2015. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nat Rev Microbiol* 13, 191-205.

Larsen, M., Dalmasso, M., Ingmer, H., Langsrud, S., Malakauskas, M., Mader, A., Møretrø, T., Možina, S., Rychlig, K., Wagner, M., Wallaceh, J., Zentek, J., Jordan, K. 2014. Persistence of foodborne pathogens and their control in primary and secondary food production chains, 92-109.



Lathrop, S.K., Binder, K.A., Starr, T., Cooper, K.G., Chong, A., Carmody, A.B., Steele-Mortimer, O., 2015. Replication of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Infect Immun* 83, 2661-2671.

Laughlin, R.C., Knodler, L.A., Barhoumi, R., Payne, H.R., Wu, J., Gomez, G., Pugh, R., Lawhon, S.D., Baumler, A.J., Steele-Mortimer, O., Adams, L.G., 2014. Spatial segregation of virulence gene expression during acute enteric infection with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *MBio* 5, e00946-00913.

Lee, A., Whyte, M.K., Haslett, C., 1993. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 54, 283-288.

Li, T., Chiang, J.Y.L., 2015. Bile acids as metabolic regulators. *Curr Opin Gastroenterol* 31, 159-165.

Liu, Q., Zhang, Y.L., Hu, W., Hu, S.P., Zhang, Z., Cai, X.H., He, X.J., 2018. Transcriptome of porcine alveolar macrophages activated by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 503, 2666-2672.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Lynch, H., Leonard, F.C., Walia, K., Lawlor, P.G., Duffy, G., Fanning, S., Markey, B.K., Brady, C., Gardiner, G.E., Arguello, H., 2017. Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Prev Vet Med* 139, 50-57.

Macpherson, A.J., Harris, N., 2019. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(6):478–485.

Martinez-Moya, M., de Pedro, M.A., Schwarz, H., Garcia-del Portillo, F., 1998. Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. *Res Microbiol* 149, 309-318.

Martins, R.P., Aguilar, C., Graham, J.E., Carvajal, A., Bautista, R., Claros, M.G., Garrido, J.J., 2013a. Pyroptosis and adaptive immunity mechanisms are promptly engendered in mesenteric lymph-nodes during pig infections with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *Vet Res* 44, 120.

Martins, R.P., Collado-Romero, M., Arce, C., Lucena, C., Carvajal, A., Garrido, J.J., 2013b. Exploring the immune response of porcine mesenteric lymph nodes to *Salmonella* enterica serovar Typhimurium: an analysis of transcriptional changes, morphological alterations and pathogen burden. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36, 149-160.

Martins, R.P., Fahraeus, R., 2017. A matter of maturity: The impact of pre-mRNA processing in gene expression and antigen presentation. *Int J Biochem Cell Biol* 91, 203-211.

Martins, R.P., Lorenzi, V., Arce, C., Lucena, C., Carvajal, A., Garrido, J.J., 2013c. Innate and adaptive immune mechanisms are effectively induced in ileal Peyer's patches of *Salmonella* Typhimurium infected pigs. *Dev Comp Immunol* 41, 100-104.

Martins, R.P., Malbert-Colas, L., Lista, M.J., Daskalogianni, C., Apcher, S., Pla, M., Findakly, S., Blondel, M., Fahraeus, R., 2019. Nuclear processing of nascent transcripts determines synthesis of full-length proteins and antigenic peptides. *Nucleic Acids Res* 47, 3086-3100.

Masters, S.L., Anna Simon, Ivona Aksentijevich, Kastner, D.L., 2009. Horror Autoinflammaticus: The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease\*. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:621–668.

Masud, S., Prajsnar, T.K., Torraca, V., Lamers, G.E.M., Benning, M., Vaart, M.V.D., Meijer, A.H., 2019. Macrophages target *Salmonella* by Lc3-associated phagocytosis in a systemic infection model. *Autophagy*. 2019;15(5):796–812.

McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R.K., 2001. Complete genome sequence of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413, 852-856.

McGhie, E.J., Brawn, L.C., Hume, P.J., Humphreys, D., Koronakis, V., 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* 12, 117-124.

McQuiston, J.R., Parrenas, R., Ortiz-Rivera, M., Gheesling, L., Brenner, F., Fields, P.I., 2004. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. J Clin Microbiol 42, 1923-1932.

Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 449, 819-826.

Megiovanni, A.M., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J.C., Boudaly, S., 2006. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. J Leukoc Biol 79, 977-988.

Mesquita, F.S., Thomas, M., Sachse, M., Santos, A.J., Figueira, R., Holden, D.W., 2012. The *Salmonella* deubiquitinase SseL inhibits selective autophagy of cytosolic aggregates. PLoS Pathog 8, e1002743.

Meyerholz, D.K., Stabel, T.J., Ackermann, M.R., Carlson, S.A., Jones, B.D., Pohlenz, J., 2002. Early epithelial invasion by *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT104 in the swine ileum. Vet Pathol 39, 712-720.

Mittrucker, H.W., Kohler, A., Kaufmann, S.H., 2002. Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella* enterica serovar Typhimurium infection. Infect Immun 70, 199-203.

Monack, D.M., Bouley, D.M., Falkow, S., 2004. *Salmonella* Typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1<sup>+/+</sup> mice and can be reactivated by IFN $\gamma$  neutralization. J Exp Med 199, 231-241.

Morel, C., Badell, E., Abadie, V., Robledo, M., Setterblad, N., Gluckman, J.C., Gicquel, B., Boudaly, S., Winter, N., 2008. Mycobacterium bovis BCG-infected neutrophils and dendritic cells cooperate to induce specific T cell responses in humans and mice. *Eur J Immunol* 38, 437-447.

Morishita, H., Mizushima, N., 2019. Diverse Cellular Roles of Autophagy. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2019;35:453–475.

Moschetta, A., 2015. Nuclear receptors and cholesterol metabolism in the intestine. *Atheroscler Suppl* 17, 9-11.

Mowat, A.M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.

Naidoo, S., Visser, E.A., Zwart, L., Toit, Y.D., Bhadauria, V., Shuey, L.S., 2018. Dual RNA-Sequencing to Elucidate the Plant-Pathogen Duel. *Curr Issues Mol Biol* 27, 127-142.

Nairz, M., Fritsche, G., Crouch, M.L., Barton, H.C., Fang, F.C., Weiss, G., 2009. Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella* enterica sv. Typhimurium by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition. *Cell Microbiol* 11, 1365-1381.

Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D., Egholm, M., Todd, J.A., 2009. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324, 387-389.

Nguyen, H.T.T., Lapaquette, P., Bringer, M.-A., Darfeuille-Michaud, A., 2019. Autophagy and Crohn's Disease. *Journal of Innate Immunity* 5, 434-443.

Ni, H., Gong, Y., Yan, J.Z., Zhang, L.L., 2010. Autophagy inhibitor 3-methyladenine regulates the expression of LC3, Beclin-1 and ZnTs in rat cerebral cortex following recurrent neonatal seizures. *World J Emerg Med* 1, 216-223.

Niedergang, F., Sirard, J.C., Blanc, C.T., Kraehenbuhl, J.P., 2000. Entry and survival of *Salmonella* Typhimurium in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not require macrophage-specific virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14650-14655.

Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J., Lind, P., 1995. The serological response to *Salmonella* serovars Typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet Microbiol* 47, 205-218.

Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., Chamaillard, M., 2011. Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(23):9601–9606.

Noto Llana, M., Sarnacki, S.H., Morales, A.L., Aya Castaneda, M.D.R., Giacomodonato, M.N., Blanco, G., Cerquetti, M.C., 2017. Activation of iNKT Cells Prevents *Salmonella*-Enterocolitis and *Salmonella*-Induced Reactive Arthritis by Downregulating IL-17-Producing gammadeltaT Cells. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 398.

Ochman, H., Soncini, F.C., Solomon, F., Groisman, E.A., 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7800-7804.

Ochman, H., Wilson, A.C., 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol* 26, 74-86.

Osterkorn, K., Czerny, C.P., Wittkowski, G., Huber, M., 2001. Sampling plan for the establishment of a serologic *Salmonella* surveillance for slaughter pigs with meat juice ELISA. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 114, 30-34.

Paesold, G., Guiney, D.G., Eckmann, L., Kagnoff, M.F., 2002. Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 4, 771-781.

Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K.L., Bentley, S.D., Holden, M.T., Sebahia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R.M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T.T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T.S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella* enterica serovar Typhi CT18. *Nature* 413, 848-852.

Pathirana, R.D., O'Brien-Simpson, N.M., Visvanathan, K., Hamilton, J.A., Reynolds, E.C., 2007. Flow cytometric analysis of adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral epithelial cells. *Infect Immun* 75, 2484-2492.

Pickard, J.M., Zeng, M.Y., Caruso, R., Nunez, G., 2017. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev* 279, 70-89.

Platzter, B., Stout, M., Fiebiger, E., 2014. Antigen cross-presentation of immune complexes. *Front Immunol* 5, 140.

Porwollik, S., Boyd, E.F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E., McClelland, M., 2004. Characterization of *Salmonella* enterica subspecies I genovars by use of microarrays. *J Bacteriol* 186, 5883-5898.

Porwollik, S., McClelland, M., 2003. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* 5, 977-989.

Porwollik, S., Wong, R.M., McClelland, M., 2002. Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8956-8961.

Preidis, G.A., Kim, K.H., Moore, D.D., 2017. Nutrient-sensing nuclear receptors PPAR $\alpha$  and FXR control liver energy balance. *J Clin Invest.* 2017;127(4):1193–1201.

Py, B.F., Kim, M.S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., Yuan, J., 2013. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell* 49, 331-338.

Ramana, C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D., Stark, G.R., 2002. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol* 23, 96-101.

Reboldi, A., Cyster, J.G., 2016. Peyer's patches: organizing B-cell responses at the intestinal frontier. *Immunol Rev* 271, 230-245.



Reglamento(2160/2003) 2003. Reglamento (CE) n° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre el control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos (Diario Oficial). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32003R2160>

Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., 2002. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med* 8, 1243-1248.

Reynolds, C.J., Jones, C., Blohmke, C.J., Darton, T.C., Goudet, A., Sergeant, R., Maillere, B., Pollard, A.J., Altmann, D.M., Boyton, R.J., 2014. The serodominant secreted effector protein of *Salmonella*, SseB, is a strong CD4 antigen containing an immunodominant epitope presented by diverse HLA class II alleles. *Immunology* 143, 438-446.

Ricke, K.G.M.H.M.K.C., 2006. Animal Feed Production and Contamination by Foodborne *Salmonella*, Springer, 1: 197.

Rieger, J., Janczyk, P., Hunigen, H., Plendl, J., 2015. Enhancement of immunohistochemical detection of *Salmonella* in tissues of experimentally infected pigs. *Eur J Histochem* 59, 2516.

Riquelme, S.A., Bueno, S.M., Kalergis, A.M., 2012. IgG keeps virulent *Salmonella* from evading dendritic cell uptake. *Immunology* 136, 291-305.

Rydstrom, A., Wick, M.J., 2007. Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral *Salmonella* infection. *J Immunol* 178, 5789-5801.

Saliba, A.E., S, C.S., Vogel, J., 2017. New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 35, 78-87.

Salzman, N.H., 2010. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: detente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* 1, 401-406.

Sanchez-Vargas, F.M., Abu-El-Haija, M.A., Gomez-Duarte, O.G., 2011. *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis* 9, 263-277.

Sánchez-Vizcaíno, J. 2010. Curso de introducción a la inmunología porcina. <http://apps.sanidadanimal.info/cursos/inmunologia/>

Sangpuii, L., Dixit, S.K., Kumawat, M., Apoorva, S., Kumar, M., Kappala, D., Goswami, T.K., Mahawar, M., 2018. Comparative roles of clpA and clpB in the survival of *S. Typhimurium* under stress and virulence in poultry. *Sci Rep* 8, 4481.

Sanz-Santos, G., Jimenez-Marin, A., Bautista, R., Fernandez, N., Claros, G.M., Garrido, J.J., 2011. Gene expression pattern in swine neutrophils after lipopolysaccharide exposure: a time course comparison. *BMC Proc* 5 Suppl 4, S11.

Sapkota, A.R., Lefferts, L.Y., McKenzie, S., Walker, P., 2007. What do we feed to food-production animals? A review of animal feed ingredients and their potential impacts on human health. *Environ Health Perspect* 115, 663-670.

Schaap, F.G., Trauner, M., Jansen, P.L., 2014. Bile acid receptors as targets for drug development. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 55-67.

Schauser, K., Olsen, J.E., Larsson, L.I., 2005. *Salmonella* Typhimurium infection in the porcine intestine: evidence for caspase-3-dependent and -independent programmed cell death. *Histochem Cell Biol* 123, 43-50.

Schettters, S.T.T., Jong, W.S.P., Horrevorts, S.K., Kruijssen, L.J.W., Engels, S., Stolk, D., Daleke-Schermerhorn, M.H., Garcia-Vallejo, J., Houben, D., Unger, W.W.J., den Haan, J.M.M., Luirink, J., van Kooyk, Y., 2019. Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8(+) T cells. *Acta Biomater* 91, 248-257.

Schroeder, N., Henry, T., de Chastellier, C., Zhao, W., Guilhaon, A.A., Gorvel, J.P., Meresse, S., 2010. The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *PLoS Pathog* 6, e1001002.

Schudel, A., Francis, D.M., Thomas, S.N., 2019. Material design for lymph node drug delivery. *Nature Reviews Materials* 4, 415-428.

Segat, L., Brandao, L.A.C., Guimaraes, R.L., Pontillo, A., Athanasakis, E., de Oliveira, R.M., Arraes, L.C., de Lima Filho, J.L., Crovella, S., 2010. Polymorphisms in innate immunity genes and patients response to dendritic cell-based HIV immuno-treatment. *Vaccine* 28, 2201-2206.

Serhan, C.N., Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6, 1191-1197.

Shahnazari, S., Yen, W.L., Birmingham, C.L., Shiu, J., Namolovan, A., Zheng, Y.T., Nakayama, K., Klionsky, D.J., Brumell, J.H., 2010. A diacylglycerol-dependent signaling pathway contributes to regulation of antibacterial autophagy. *Cell Host Microbe* 8, 137-146.

Sheng, X., Zhang, H., Xia, Q., Xu, S., Xu, H., Huang, X., 2013. Mig-14 plays an important role in influencing gene expression of *Salmonella* enterica serovar Typhi, which contributes to cell invasion under hyperosmotic conditions. Res Microbiol 164, 903-912.

Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., Shao, F., 2014. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. Nature 514, 187-192.

Shi, Q., Zhuang, F., Liu, J.T., Li, N., Chen, Y.X., Su, X.B., Yao, A.H., Yao, Q.P., Han, Y., Li, S.S., Qi, Y.X., Jiang, Z.L., 2019. Single-cell analyses reveal functional classification of dendritic cells and their potential roles in inflammatory disease. Faseb j 33, 3784-3794.

Shields-Cutler, R.R., Crowley, J.R., Miller, C.D., Stapleton, A.E., Cui, W., Henderson, J.P., 2016. Human Metabolome-derived Cofactors Are Required for the Antibacterial Activity of Siderocalin in Urine. J Biol Chem 291, 25901-25910.

Skallerup, P., Nejsum, P., Cirera, S., Skovgaard, K., Pipper, C.B., Fredholm, M., Jorgensen, C.B., Thamsborg, S.M., 2017. Transcriptional immune response in mesenteric lymph nodes in pigs with different levels of resistance to *Ascaris suum*. Acta Parasitol 62, 141-153.

Sorrell, J.M., Caplan, A.I. 2009. Chapter 4 Fibroblasts—A Diverse Population at the Center of It All, In, 161-214.

Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A.W., Westendorf, A.M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A.J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., von Mering, C., Hardt, W.D., 2007. *Salmonella* enterica serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. PLoS Biol 5, 2177-2189.

Stein, M.A., Leung, K.Y., Zwick, M., Garcia-del Portillo, F., Finlay, B.B., 1996. Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. Mol Microbiol 20, 151-164.

Stewart, M.K., Cummings, L.A., Johnson, M.L., Berezow, A.B., Cookson, B.T., 2011. Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 20742-20747.

Tanaka, T., Imai, Y., Kumagai, N., Sato, S., 2010. The effect of feeding lactic acid to *Salmonella* Typhimurium experimentally infected swine. J Vet Med Sci 72, 827-831.

Tattoli, I., Sorbara, M.T., Vuckovic, D., Ling, A., Soares, F., Carneiro, L.A., Yang, C., Emili, A., Philpott, D.J., Girardin, S.E., 2012. Amino acid starvation induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. Cell Host Microbe 11, 563-575.

Teo, W.X., Yang, Z., Kerr, M.C., Luo, L., Guo, Z., Alexandrov, K., Stow, J.L., Teasdale, R.D., 2017. *Salmonella* effector SopD2 interferes with Rab34 function. Cell Biol Int 41, 433-446.

Theng, S.S., Wang, W., Mah, W.C., Chan, C., Zhuo, J., Gao, Y., Qin, H., Lim, L., Chong, S.S., Song, J., Lee, C.G., 2014. Disruption of FAT10-MAD2 binding inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E5282-5291.

Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M., Euzéby, J.P., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 521-524.

Toldo, S., Marchetti, C., Mauro, A.G., Chojnacki, J., Mezzaroma, E., Carbone, S., Zhang, S., Van Tassell, B., Salloum, F.N., Abbate, A., 2016. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse. *Int J Cardiol* 209, 215-220.

Townsend, S.M., Kramer, N.E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., Stevens, K., Maloy, S., Parkhill, J., Dougan, G., Baumler, A.J., 2001. *Salmonella* enterica serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* 69, 2894-2901.

Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, K., Shah, A.H., Stahl, P.D., Groisman, E.A., 1999. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *Embo j* 18, 3924-3933.

Uribe JH, Collado-Romero M, Zaldívar-López S, et al. Transcriptional analysis of porcine intestinal mucosa infected with *Salmonella* Typhimurium revealed a massive inflammatory response and disruption of bile acid absorption in ileum. *Vet Res*. 2016;47:11.

Van Parys, A., Boyen, F., Volf, J., Verbrugghe, E., Leyman, B., Rychlik, I., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2010. *Salmonella* Typhimurium resides largely as an extracellular pathogen in porcine tonsils, independently of biofilm-associated genes csgA, csgD and adrA. *Vet Microbiol* 144, 93-99.

Vanaja, S.K., Rathinam, V.A., Fitzgerald, K.A., 2015. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol* 25, 308-315.

Vavassori, P., Mencarelli, A., Renga, B., Distrutti, E., Fiorucci, S., 2009. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol* 183, 6251-6261.

Verbrugghe E, Boyen F, Van Parys A, et al. Stress induced *Salmonella* Typhimurium recrudescence in pigs coincides with cortisol induced increased intracellular proliferation in macrophages. *Vet Res*. 2011;42(1):118.

Vinod, N., Noh, H.B., Oh, S., Ji, S., Park, H.J., Lee, K.S., Kim, S.C., Park, H.O., Yang, J.S., Choi, C.W., 2017. A *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine induces cytokine expression in vitro and immune responses in vivo and protects rats against homologous and heterologous challenges. *PLoS One* 12, e0185488.

von Andrian, U.H., Mempel, T.R., 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3, 867-878.

Waddell, L.A., Lefevre, L., Bush, S.J., Raper, A., Young, R., Lisowski, Z.M., McCulloch, M.E.B., Muriuki, C., Sauter, K.A., Clark, E.L., Irvine, K.M., Pridans, C., Hope, J.C., Hume, D.A., 2018. ADGRE1 (EMR1, F4/80) Is a Rapidly-Evolving Gene Expressed in Mammalian Monocyte-Macrophages. *Front Immunol* 9, 2246.

Wahlstrom, A., Sayin, S.I., Marschall, H.U., Backhed, F., 2016. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab* 24, 41-50.

Wang, S., Sun, Z., Zhao, W., Wang, Z., Wu, M., Pan, Y., Yan, H., Zhu, J., 2016. CD97/ADGRE5 Inhibits LPS Induced NF-kappaB Activation through PPAR-gamma Upregulation in Macrophages. *Mediators Inflamm* 2016, 1605948.

Autophagy Total Solution. 2019. [www.ibric.org](http://www.ibric.org).

Weiman S, author; Fox J, editor. 2015. Harnessing the Power of Microbes as Therapeutics: Bugs as Drugs: Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in San Diego, CA, in April 2014. Washington (DC): American Society for Microbiology.

Wells, J.M., Loonen, L.M., Karczewski, J.M., 2010. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int J Med Microbiol* 300, 41-48.

Westermann, A.J., Barquist, L., Vogel, J., 2017. Resolving host-pathogen interactions by dual RNA-seq. *PLoS Pathog* 13, e1006033.



Wick, M.J., 2004. Living in the danger zone: innate immunity to *Salmonella*. *Curr Opin Microbiol* 7, 51-57.

Wieczorek, M., Abualrous, E.T., Sticht, J., Alvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noe, F., Freund, C., 2017. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol* 8, 292.

Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., Chausse, A.M., Schikora, A., Velge, P., 2014. Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Front Microbiol* 5, 791.

Winter, S.E., Thiennimitr, P., Winter, M.G., Butler, B.P., Huseby, D.L., Crawford, R.W., Russell, J.M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tsois, R.M., Roth, J.R., Baumler, A.J., 2010. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 467, 426-429.

Wlodarska, M., Thaiss, C.A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.P., Brown, E.M., Frankel, G., Levy, M., Katz, M.N., Philbrick, W.M., Elinav, E., Finlay, B.B., Flavell, R.A., 2014. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* 156, 1045-1059.

Wolf, T., Kammer, P., Brunke, S., Linde, J., 2018. Two's company: studying interspecies relationships with dual RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* 42, 7-12.

Wu, Y.T., Tan, H.L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M.R., Ong, C.N., Codogno, P., Shen, H.M., 2010. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 285, 10850-10861.

Xia, X., Wang, X., Zheng, Y., Jiang, J., Hu, J., 2019. What role does pyroptosis play in microbial infection? *J Cell Physiol* 234, 7885-7892.

Xu, Z., Zhong, H., Huang, S., Zhou, Q., Du, Y., Chen, L., Xue, C., Cao, Y., 2019. Porcine deltacoronavirus induces TLR3, IL-12, IFN-alpha, IFN-beta and PKR mRNA expression in infected Peyer's patches in vivo. *Vet Microbiol* 228, 226-233.

Yu, H.B., Croxen, M.A., Marchiando, A.M., Ferreira, R.B.R., Cadwell, K., Foster, L.J., Finlay, B.B., Zychlinsky, A., 2014. Autophagy Facilitates *Salmonella* Replication in HeLa Cells. *mBio*. 2014;5(2):e00865-14.

Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., Tontonoz, P., 2009. LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor. *Science*. 2009;325(5936):100–104.

Zhang, L., Gao, Z., Yu, L., Zhang, B., Wang, J., Zhou, J., 2018. Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors in teleost fish: Current knowledge and future perspectives. *J Fish Dis* 41, 1317-1330.

Zheng, Y., Zhao, G., Xu, B., Liu, C., Li, C., Zhang, X., Chang, X., 2016. PADI4 has genetic susceptibility to gastric carcinoma and upregulates CXCR2, KRT14 and TNF-alpha expression levels. *Oncotarget* 7, 62159-62176.

